

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005601

International filing date: 18 March 2005 (18.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: US  
Number: 60/607,359  
Filing date: 07 September 2004 (07.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 16 June 2005 (16.06.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

24. 5. 2005

PA 1294613

# THE UNITED STATES OF AMERICA

**TO ALL TO WHOM THESE PRESENTS SHALL COME:**

**UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE**

**United States Patent and Trademark Office**

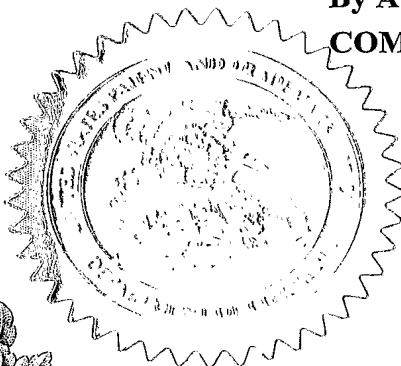
**March 14, 2005**

**THIS IS TO CERTIFY THAT ANNEXED HERETO IS A TRUE COPY FROM THE RECORDS OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE OF THOSE PAPERS OF THE BELOW IDENTIFIED PATENT APPLICATION THAT MET THE REQUIREMENTS TO BE GRANTED A FILING DATE UNDER 35 USC 111.**

**APPLICATION NUMBER: 60/607,359**

**FILING DATE: September 07, 2004**

**By Authority of the  
COMMISSIONER OF PATENTS AND TRADEMARKS**



*Trudie Wallace*  
**TRUDIE WALLACE**  
**Certifying Officer**

**PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT COVER SHEET**

This is a request for filing a PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT under 37 CFR 1.53(c).

19249 U.S. PTO

601/607359

000704

**INVENTOR(S)**

Given Name (first and middle [if any])	Family Name or Surname	Residence (City and either State or Foreign Country)	
Yuko MASHIMA		Tokyo	JAPAN

☐ Additional inventors are being named on the \_\_\_\_\_ separately numbered sheet(s) attached hereto
**TITLE OF THE INVENTION (500 characters max)**

METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC NEUROPATHY

**CORRESPONDENCE ADDRESS**

Direct all correspondence to the address for SUGHRUE MION, PLLC filed under the Customer Number listed below:

WASHINGTON OFFICE

**23373**

CUSTOMER NUMBER

**ENCLOSED APPLICATION PARTS (check all that apply)**

- ☒ Specification    Number of Pages    106    ☐ CD(s), Number \_\_\_\_\_  
☐ Drawing(s)    Number of Sheets    \_\_\_\_\_    ☐ Other (specify) \_\_\_\_\_  
☐ Application Data Sheet. See 37 CFR 1.76

**METHOD OF PAYMENT OF FILING FEES FOR THIS PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT**

- ☒ Applicant claims small entity status. See 37 CFR 1.27.  
☐ A check or money order is enclosed to cover the Provisional filing fees. The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.  
☒ The USPTO is hereby authorized to charge the Provisional filing fees to our Deposit Account No. 19-4880. The USPTO is directed and authorized to charge all required fees, except for the Issue Fee and the Publication Fee, to Deposit Account No. 19-4880. Please also credit any overpayments to said Deposit Account.

FILING FEE  
AMOUNT (\$)

\$80.00

The invention was made by an agency of the United States Government or under a contract with an agency of the United States Government.

- ☒ No.  
☐ Yes, the name of the U.S. Government agency and the Government contract number are: \_\_\_\_\_

Respectfully submitted,

SIGNATURE

*Bruce E. Kramer*

DATE September 7, 2004

TYPED or PRINTED NAME Bruce E. Kramer

REGISTRATION NO. 33,725

TELEPHONE NO. (202) 293-7060

DOCKET NO. P83514

**USE ONLY FOR FILING A PROVISIONAL APPLICATION FOR PATENT**

## DESCRIPTION

### METHOD FOR DIAGNOSIS OF OPTIC NEUROPATHY

#### 5 TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a method and kit for diagnosis of optic neuropathy.

#### BACKGROUND ART

Glaucoma is a major cause of blindness worldwide, and  
10 estimated approximately 67 million persons suffered from some  
form of glaucoma. The majority of cases occur as late adult  
onset (typically over age 40 years) of primary open-angle  
glaucoma (POAG), which is the most common form of glaucoma and  
affects approximately 2% in white population and 7% of black  
15 population over 40 years old. POAG results in a characteristic  
visual field changes corresponding to the excavation of the  
optic disc that is usually associated with an elevation of  
intraocular pressure (IOP). Normal-tension glaucoma (NTG) is  
a form of open-angle glaucoma in which typical glaucomatous  
20 cupping of the optic nerve head and visual field loss are  
present but in which there is no evidence of increased IOP over  
21 mm Hg at all times. In Japan, prevalence of glaucoma is  
approximately 3.5 % over 40 years old: POAG 0.58 % and NTG 2.04 %.  
Prevalence of NTG in Japanese population is high compared with  
25 that in other populations. Glaucoma is a multifactorial

disorder characterized by a progressive optic neuropathy associated with a specific visual field loss, and results from the interaction of multiple genes and environmental influences, although intraocular pressure (IOP) is a major risk factor for  
5 glaucoma.

Risk factors to develop glaucoma include high IOP, age, race, positive family history, myopia, the presence of diabetes or hypertension, and genetic factors. Although the exact pathogenesis of glaucomatous optic neuropathy is remains  
10 unclear, it is generally accepted that an increased IOP is a major risk factor. Current treatment for glaucoma consists of interventions which lower IOP. However, in some patients with glaucoma, NTG or advanced stage of POAG, reduction of IOP does not prevent the progression of the disease, indicating that  
15 factors other than an increased IOP may be involved in the development or progress of glaucoma.

POAG and NTG are a heterogeneous group of conditions probably with different multi-factorial etiologies resulting in the observed patterns of neuronal loss in the optic disk.  
20 The association between glaucoma and the presence of many systemic vascular diseases including low systemic blood pressure, nocturnal dips in blood pressure, hypertension, migraine, vasospasm, and diabetes has been reported. The presence of optic disc hemorrhages in NTG patients suggests  
25 that vascular insufficiencies are deeply involved in the

development and progression of NTG. A high percentage of patients with POAG receive a wide variety of medications for coexisting disorder. Especially, systemic hypertension was the most common disorder, occurring in 48% of the total  
5 population.

Glaucoma-like morphological changes have been reported in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON) at the atrophic stage and dominant optic atrophy (DAO). Recently, the inventor has reported optic disc excavation by  
10 a quantitative analysis using Heidelberg retinal tomography (HRT) in the atrophic stage of Japanese 15 patients with LHON harboring the 11778 mutation. LHON is a maternally-transmitted eye disease that mainly affects young adult men. Approximately 70% of patients were male. This  
15 disease usually causes severe and permanent loss of vision resulting in a visual acuity of less than 0.1. Visual field defects are present as central or cecocentral scotomas. So far more than 20 point mutations of mitochondrial DNA (mtDNA) have been reported in LHON patients worldwide, and more than 80%  
20 of LHON patients carry one of three mtDNA mutations at nucleotide position 3460, 11778, or 14484.

The major difference among LHON patients with one of these mtDNA mutations is in the clinical course. The 3460 and 14484 mutations are associated with better visual prognosis  
25 than the 11778 mutation which shows visual recovery rates of

only 4% to 7%. However, visual recovery has been documented in some patients with the 11778 mutation and an age of onset in the low teens. Recovery of vision appears to be more likely when visual deterioration begins at an early age, even in  
5 patients with the 11778 mutation.

The clinical variability of LHON patients, which includes age at onset, male predilection, incomplete penetrance, and visual recovery, suggests that the disease most likely results from polygenic or multifactorial  
10 mechanisms, possibly involving environmental stressors, X-chromosomal loci, and other mtDNA mutations. However, attempts to identify a relevant locus on the X-chromosome have not been successful. So-called "secondary LHON mutations" are more frequently found in European LHON patients than in  
15 unaffected Europeans and are polymorphisms linked to the European haplotype J. These polymorphisms are not strong autonomous risk factors.

Thus, the primary mutations are the major risk factors in LHON, but additional etiologic factors that augment or  
20 modulate the pathogenic phenotypes appear to be necessary. Considerable evidence indicates that heavy alcohol and/or tobacco use increases the risk of optic neuropathy in LHON families, although one study did not find this association. Possible secondary genetic interactions are complex and not  
25 firmly established.

【発明の開示】

本発明者は、視神経症、特に緑内障およびレーベル病を発症する危険因子を検出可能な危険遺伝子を鋭意検討の結果、視神経症の発症との関連性の高いいくつかの遺伝子多型を見出した。

- 5 即ち、本発明は、生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程を含む、生体試料の遺伝子多型の検出方法に関する。

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

- 10 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損

- 15 (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

- 20 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

(8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子：コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

- 25 (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン



- (1 1) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (1 2) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (1 3) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (1 4) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチ  
5 ミンまたはグアニン
- (1 5) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシ  
トシンまたはチミン
- (1 6) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシ  
トシンまたはアデニン
- 10 (1 7) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニ  
ンまたはアデニン
- (1 8) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 385 位がシトシ  
ンまたはアデニン
- (1 9) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子：塩基番号 102 位がチミンま  
15 たはシトシン
- (2 0) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子：コドン番号 23 位がシチジ  
ンまたはセリン
- (2 1) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型
- (2 2) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型
- 20 (2 3) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子：塩基番号 190  
位がグアニンまたはシトシン
- (2 4) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子：塩基番号 677  
位がシトシンまたはチミン
- (2 5) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子：コドン番号 192 位がグリシン  
25 またはアルギニン

- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン
- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- 5 (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- 10 (31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- (32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- 15 (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン
- (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイ
- 20 シン
- (36) OPTN (オプチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- (37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン
- 25 (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび

OPTN 遺伝子：塩基番号 412 位がアデニン

(39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ ) 遺伝子：塩基番号-863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子：塩基番号 603 位がアデニン

(40) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

- 5 (41) ミクロソーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

また、本発明は、以下の工程 [I] から [III] を含む、視神経症の診断方法に関する。

- [I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1  
10 つを解析する工程

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

- 15 (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損

(4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

- (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシン  
20 またはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

- 25 (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子：コドン番号 277 位のロイシン

をコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

- (9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (11) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- 5 (12) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子：塩基番号-521 位がシ
- 10 トシンまたはチミン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子：塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- 15 (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子：塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子：塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子：コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- 20 (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型
- (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子：塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- 25 (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子：塩基番号 677

- 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン  
またはアルギニン
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまた  
5 はメチオニン
- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステイ  
ンまたはセリン
- (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領  
域における 1G/2G
- 10 (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306  
位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領  
域における 5A/6A
- (31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリン  
15 またはグリシン
- (32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ  
シンまたはアルギニン
- (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギ  
ニンまたはグリシン
- 20 (34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ  
オニンまたはイソロイシン
- (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイ  
シン
- (36) OPTN (オプチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまた  
25 はアデニン

(37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子：塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

(38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子：塩基番号 857 位がチミンおよび OPTN 遺伝子：塩基番号 412 位がアデニン

5 (39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子：塩基番号 863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子：塩基番号 603 位がアデニン

(40) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(41) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

10 [I I] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を決定する工程、および

[I I I] 決定された遺伝子型から視神経症の遺伝的リスクを求める工程。

本発明は、特に前記工程 [I] において (1) ~ (39) のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴とする緑内障の診断方法、または (4  
15 0) ~ (41) のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴とするレーベル病の診断方法に関する。

#### 【発明の実施形態】

本発明において、「C9099A」等の表記は、遺伝子の塩基置換（ヌクレオチド置換）を示し、具体的には遺伝子の塩基番号 9099 位のシトシン (C) がアデニ  
20 ン (A) に変異していることを意味する。またこれは、塩基番号 9099 位にシトシン (C) またはアデニン (A) を有する遺伝子多型が存在することを示すものでもある。

本発明において、「Gln192Arg」等の表記は、遺伝子の塩基置換に伴うアミノ酸置換を示し、具体的にはタンパクのコドン番号（アミノ酸番号）192 位の  
25 グリシン (Gln) がアルギニン (Arg) に変異していることを意味する。また

はこれは、コドン番号 192 位にグリシン (Gln) またはアルギニン (Arg) を有するタンパク多型が存在することを示すものでもある。

本発明において、「遺伝子多型」とは、遺伝子中のある部位において、ヒトによって 2 種以上の塩基が存在することをいい、いわゆる単一ヌクレオチド多型 (single nucleotide polymorphism: SNP) および複数ヌクレオチドからなる配列にわたる多型の両方を含む。遺伝子多型は遺伝子の発現や活性における変化を結果として生じないものであっても、あるいは遺伝子の発現や活性における変化を結果として生じるものであっても良い。また、遺伝子の塩基配列が野生型 (正常遺伝子の塩基配列) には存在しない場合、遺伝子変異というが、  
10 遺伝子変異も本発明の遺伝子多型に含まれる。

本発明において、遺伝子多型の検出は、遺伝子多型ごとに、または複数もしくは全部同時に行ってもよい。また、検出に用いられる遺伝子多型は、本発明にて視神経症との関連が新規に見出された遺伝子多型に加えて、従来から視神経症との関連が知られている公知の遺伝子多型を含めて行ってもよい。複数の  
15 遺伝子多型を用いることで、視神経症の診断確率をより高めることが可能となる。

本発明において、遺伝子多型を検出する方法は特に限定されるものでなく、通常公知の方法を用いることができる。代表的な検出方法としては、PCR-RFLP 法 (制限酵素切断断片長多型解析)、PCR-SSCP 法 (一本鎖 DNA 高次構造多型解析)、ASO ハイブリダイゼーション法、ダイレクトシーケン  
20 ス法、ARMS 法、DGGE 法、RNA seA 切断法、化学切断法、DPL 法、TaqMan PCR 法、インベーター法、MALDI-TOF/MS 法、TDI 法、一塩基伸長法、WAVE 法、一分子蛍光検出法などが挙げられる。本発明の方法においては、これらの検出方法は単独で用いても、任意に組み合わせ  
25 て用いてもよい。

本発明において、遺伝子多型の検出に供される生体試料は特に限定されるものではなく、例えば、毛髪、血液、唾液、リンパ液、気道粘液、培養細胞、尿などから得ることができる。

5 本発明において、「診断」とは、発症の診断のみならず、発症を早める危険因子および病態を進行させる危険因子の診断も含まれる。

本発明は、本発明の検出方法または診断方法に使用されるキット（遺伝子あるいはタンパク多型検出用キット、または視神経症診断用キット）を提供する。該キットには、先述の（１）～（４１）の多型からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子多型を検出または解析するための遺伝子プライマーやプロ  
10 ープ、またはタンパク多型を検出または解析するための抗体などが含まれる。

本発明において、「プライマー」とは、ヌクレオチドの複製を行う際必要な、複製開始点となる相補的ヌクレオチド断片を意味し、「プローブ」とは、組換えDNA実験で目的遺伝子を探り出すためのDNA、RNAの断片を意味する。プライマーまたはプローブは、目的の遺伝子多型が存在する部位またはその周辺の配  
15 列に特異性を有するものであって、他の遺伝子と同じでなければ（例えば、繰り返し配列やパリンドローム配列でないことなどが必要）特に制限されず、DNA合成の態様、合成するDNAの領域および塩基長などに応じて適宜選択することができる。本発明のプライマーまたはプローブは、DNA自動合成等の公知の方法を利用して本発明で開示する塩基配列に従って合成することができ  
20 る。

#### 【発明の効果】

本発明によれば、視神経症（特に緑内障、レーベル病など）に関連する遺伝子多型が解析され、生体試料の遺伝子型が検出される。この遺伝子型の検出によって得られる多型情報を用いることにより、該疾患のリスク診断を行うこと  
25 が可能となる。



また、視神経症と関連の高いいくつかの遺伝子多型を用いた解析を組み合わせることによって、信頼性が高く、高精度で予知確率の高いリスク診断することが可能となる。

例えば、開放隅角緑内障の原因遺伝子として、現在ミオシリン、オブチニュー  
5 リンの遺伝子変異の2つが明らかになっているが、他にも4つ染色体上にその存在が知られている。これら公知の変異遺伝子と本発明で緑内障との関連が明らかとなった遺伝子多型（変異を含む）を持てば、ほぼ100%緑内障を発症することが予測されるので、発症前診断として有効である。

さらに、人種や性別において視神経症との関連性が認められたSNPについ  
10 ては、その遺伝子多型を単独で解析することによっても、極めて高い確率でリスク診断することが可能となる。

また、得られた遺伝子多型情報に基づき、統計学的な解析を行うことによっ  
て、発症年齢の予測、生活習慣病の関与の予測、症候因子の関与の予測、点眼  
剤や内服剤の反応性の予測を行うことが可能となる。したがって、発症前診断  
15 による早期発見により、危険因子の除去（生活、環境改善の改善の指導）およ  
び早期治療（変異遺伝子の除去、遺伝子に基づく適切な治療の開始）などを行  
うことが可能となり、患者の症状に応じたオーダーメイド医療によって失明率  
を低下することが可能となる。

早期治療としては、例えば、本発明の診断方法を実施した結果、解析対象の  
20 多型が視神経症の発症リスクを高める遺伝子型であった場合に、発症リスクの  
低い遺伝子型を有する遺伝子を生体内に導入して発現させれば、当該遺伝子が  
発現することによって症状の軽減、発症の抑制、発症リスクの軽減などを期待  
できる。また、発症リスクの高い遺伝子型を有する遺伝子のmRNAに対する  
アンチセンス鎖を導入するか、RNAi法を用いることによって、当該mRNA  
25 の発現を抑制する方法によっても、同様の治療効果が期待される。

また、原因遺伝子がどのように視神経症の発症に関与しているかの解析により、視神経症の原因解明が可能となり、病態生理に基づいた新たな治療薬の開発が可能となる。

さらに、本発明の診断対象である視神経症の遺伝子多型情報と内科領域で行  
5 われると考えられる生活習慣病の疾患遺伝子多型情報を組み合わせることによ  
って、総合的な内科診断を、生活習慣病や高齢者の加齢に伴う疾患の総合的な  
リスク診断に役立てることが可能になり、質の高い QOL (Quality of life)  
に役立てることが可能となる。

以下、本発明を試験例によりさらに詳細に説明するが、これは本発明の範囲  
10 を限定するものではない。

EXAMPLE 1 Polymorphic Variants of Genes Associated with  
Apoptosis and Oxidative Stress in Leber's Hereditary Optic  
Neuropathy

15

Purpose: To determine whether genetic polymorphisms for  
oxidative stress and apoptosis cause the clinical variability  
in patients with Leber's hereditary optic neuropathy (LHON).

MATERIALS AND METHODS

20 Patients

We studied 86 unrelated Japanese patients with LHON  
carrying the 11778 mutation with homoplasmy. Their mtDNA  
mutation was confirmed by polymerase chain reaction followed  
by a restriction-enzyme assay which revealed concordant gain  
25 of an MaeIII site.

The mean age at the onset of visual loss in 86 LHON patients was  $25.1 \pm 13.0$  years with a range 3 to 65 years.

#### Genomic DNA Extraction and Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood leukocytes by the SDS-proteinase K and phenol/chloroform extraction method. Polymorphisms were examined in the oxidative stress-related gene, microsomal epoxide hydrolase (EPHX1), and the apoptosis-related gene, TP53.

Each polymorphism was identified using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques (Table 1).

Table 1. Primer sequences, product size, and annealing temperatures

Gene	Primer sequences	Product Size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Restriction Enzyme
TP53	F TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA	199	60.0	Acc II
	R TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC			
EPHX1	F GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C	165	56.0	EcoR V
	R TCA ATC TTA GTC TTG AAG TGA GGA T			

#### RESULTS

The associations between age at onset and the polymorphisms were presented in Table 2-1 and Table 2-2.

Table 2-1. Association between age at onset and TP53 (Arg72Pro) and EPHX1 (Tyr113His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

Gene	Genotype		P
TP53 (Arg72Pro)	Arg/Arg	Arg/Pro + Pro/Pro	0.009
Age at onset	$20.7 \pm 10.6$ (n=35)	$28.1 \pm 13.8$ (n=51)	
EPHX1 (Tyr113His)	Tyr/Tyr + Tyr/His	His/His	0.038
Age at onset	$27.9 \pm 13.9$ (n=45)	$22.1 \pm 11.4$ (n=41)	

P Value for t-test

Table 2-2. Association between age at onset and TP53 (Arg/Arg) and EPHX1 (His/His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

5	Group 1	Group 2	Group 3	P
	Arg/Arg and His/His	Arg/Arg or His/His	others	
	17.7±9.3 (n=19)	25.3±11.3 (n=38)	29.8±15.1 (n=29)	0.0044

P value for Kruskal-Wallis

Group 1: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 and His/His at codon 113 in EPHX1

Group 2: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 but not His/His  
10 at codon 113 in EPHX1, or His/His at codon 113 in EPHX1 but not Arg/Arg at codon 72 in TP53

Group 3: Patients other than Groups 1 and 2

As shown in Table 2-1, the codon 72 genotype in TP53  
15 and the codon 113 genotype in EPHX1 were significantly associated with younger age at onset of Leber's hereditary optic neuropathy.

As shown in Table 2-2, the co-existence of the Codon 72 genotype in TP53 and the codon 113 genotype in EPHX1 were  
20 significantly associated with younger age at onset of Leber's hereditary optic neuropathy.

These results indicated that detection of the Arg/Arg homozygote in TP53 and His/His homozygote in EPHX1 make possible the early diagnosis and early treatment of Leber's  
25 hereditary optic neuropathy.

These results also indicated that the Codon 72 polymorphism may interact with mitochondrial dysfunction to influence disease expression. Individual variations may exist in the apoptotic response that is correlated with the polymorphism at codon 72 of p53. Bonafe et al (Biochem Biophys Res Commun 2002;299:539-541.) reported that cultured cells from healthy subjects carrying the Arg/Arg genotype underwent more extensive apoptosis than cells from Arg/Pro subjects in response to the cytotoxic drug cytosine arabinoside. Thus, naturally occurring genetic variability at the p53 gene could partly explain individual differences in *in vivo* susceptibility of cells to a chemotherapeutic drug. Dumont et al (Nat Genet 2003;33:357-365) reported that the Arg72 variant was more efficient than the Pro72 variant at inducing apoptosis, with at least one mechanism underlying this greater efficiency being enhanced localization of Arg72 variant to mitochondria in tumor cells. The synthetic p53 inhibitors might be highly effective in treating LHON in which neurons died by apoptosis triggered by mitochondrial impairment and oxidative stress.

Example 2 Mitochondrial DNA mutations related with Leber's hereditary optic neuropathy in primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma

## Materials and Methods

### Patients

A total of 651 blood samples were collected at seven institutions in Japan. There were 201 POAG patients, 232 NTG patients, and 218 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study.

The mean age at the time of examination was  $61.2 \pm 16.0$  years in POAG,  $58.8 \pm 13.6$  years in NTG, and  $70.6 \pm 10.9$  years in the control subjects. The mean age of the control subjects was significantly older than that of POAG patients ( $P < 0.001$ ) and the NTG patients ( $P < 0.001$ ). We purposely selected older control subjects to reduce the probability that a subset of them would eventually develop glaucoma. There were 112 (55.7%) men in the POAG group, 108 (46.6%) in the NTG group, and 89 (40.8%) in the control group.

Patients were considered to have POAG if they had a normal open-angle, a cup-disc ratio greater than 0.7 with typical glaucomatous visual field loss on either Goldmann or Humphrey perimetry, and the absence of ocular, rhinologic, neurological, or systemic disorders which might be responsible for the optic nerve damage. Patients with NTG had an IOP of 21 mmHg or lower. Patients with exfoliative glaucoma, pigmentary glaucoma, and corticosteroid-induced glaucoma were excluded.

Two-hundred-eighteen control samples were obtained

from Japanese subjects, who had no known eye abnormalities except for cataracts. These subjects were older than 40 years, had IOPs below 21 mm Hg, had normal optic discs, and no family history of glaucoma.

## 5 Detection of mtDNA Mutations by Invader® Assay

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods of phenol-chloroform extraction.

The primary probes (wild and mutant probes) and Invader® oligonucleotides (Invader® probe) used to detect the six mtDNA mutations (G3460A, T9101C, G9804A, G11778A, T14484C, and T14498C) by the Invader® assay are shown in Table 3.

Table 3 The oligonucleotide sequence of wild type, mutant, and Invader probes with Invader assay to detect mutations of mtDNA

15	Nucleotide	Target	Probe	Sequence	Tm	Dye
	G3460A	Anti-sense	Wild	ACGGACGGGAGgccataaaactcttcacca	63.2	RED
			Mutant	CGGCGCGAGGaccataaaactcttcacaaa	63.3	FAM
			Invader	ccctacggggtactacaaccttcgtctgact	77.7	
	T9101C	sense	Wild	CGGCGCGAGGatgataagtgttagaggggaagg	64.1	FAM
			Mutant	ACGGACGGGAGgtgataagtgttagaggggaag	62.2	RED
			Invader	ggcgacagcgatttctaggatagtcagtagaattagaattgtgaagT	76.8	
	G9804A	anti-sense	Wild	ACGGACGGGAGgccacaggtttcca	63.7	FAM
			Mutant	CGGCGCGAGGaccacaggtttccac	63.7	RED
			Invader	catttccgacggcatctacgggtcacaacattttttgtat	76.7	
20	G11778A	Anti-sense	Wild	ACGGACGGGAGgcatcataatctctctcaag	63.5	RED
			Mutant	CGGCGCGAGGacatcataatctctctcaag	62.2	FAM
			Invader	gcctagcaaaactcaaaactacgaacgcactcacagtct	77.7	
	T14484C	Sense	Wild	CGGCGCGAGGatgggtgtctttggatatactac	63.4	FAM
			Mutant	ACGGACGGGAGgtgggtgtctttggatatacta	62.8	RED
			Invader	ttttgggggagggttatatgggtttaatagtttttttaattatttagggggaatgt	76.0	
	T14498C	sense	Wild	CGGCGCGAGGatttaggggaatgatggt	64.0	FAM
			Mutant	ACGGACGGGAGgttttagggggaatgatgg	62.7	RED
			Invader	tgttattattctgaattttgggggaggttatatgggtttaatagtttttttaattttT	74.1	

25 Invader® assay FRET-detection 256-well plates (Third

Wave Technologies, Inc, Madison, WI) contains the generic components of an Invader® assay (Cleavase® enzyme VIII, FRET probes, MOPS buffer, and polyethylene glycol) dried in each of the individual wells. The biplex format of the Invader® assay enabled simultaneous detection of two DNA sequences in a single well.

The detail method was described previously. In brief, 8 µl of the primary probe/Invader®/mixture and total DNA (10 ng) samples were added to each well of a 96-well plate, and were denatured by incubation at 95° C for 10 min. After 15 µl of mineral oil (Sigma, St. Louis, MO) was overlaid on all reaction wells, the plate was incubated isothermally at 63° C for 2 hours in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) and then kept at 4° C until fluorescence measurements. The fluorescence intensities were measured on a CytoFluor 4000 fluorescence plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA) with excitation at 485 nm/20 nm (wavelength/ bandwidth) and emission at 530 nm/25 nm for FAM dye; excitation at 560 nm/20 nm and emission at 620 nm/40 nm for Redmond RED (RED) dye. Each samples was tested in duplicate in the same plate and two fluorescence measurements were performed in each plate. Thus, four measurements were obtained for each sample and they were averaged.

#### Direct DNA Sequencing

To detect mutations by direct sequencing, the PCR



products were first purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valenica, CA, USA) to remove unreacted primers and precursors. The sequencing reactions were then performed using the ABI PRISM BigDye Terminator 5 (v.3.1) Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The data were collected by the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by the ABI PRISM sequencing analysis program (v.3.7).

Table 4. Primer sequences

10	mutation	Primer Sequences	
		(5' to 3')	
	3460	F	CAG TCA GAG GTT CAA TTC CTC
		R	TGG GGA GGG GGG TTC ATA GTA
	11778	F	GGC GCA GTC ATT CTC ATA AT
		R	AAG TAG GAG AGT GAT ATT TG
	14484	F	無し
		R	GCT TTG TTT CTG TTG AGT GT
	9101	F	AAA ATG CCC TAG CCC ACT TC
		R	GTC ATT ATG TGT TGT CGT GC
	9804	F	CAC ATC CGT ATT ACT CGC AT
15		R	CGG ATG AAG CAG ATA GTG AG

## RESULTS

A total of 651 Japanese subjects were studied. When a nucleotide substitution is located within a primary probe or an invader probe, the examined cases showed no reaction to both 20 probes by Invader assay. In such cases, direct sequence analysis showed single nucleotide polymorphisms (SNPs) at the nucleotide position of 9099, 9101, 9102, 9797, and 9815.

As shown in Table 5, 7 patients including 5 females and 2 males harbored 5 mutations of mtDNA, and have not developed 25 LHON. Two patients (Cases 1 and 2) harbored novel amino acid

changes which have not been associated with LHON, and 5 patients (Cases 3 to 7) harbored LHON mutations.

These mtDNA mutations were not detected in normal controls.

5

Table 5.

Case	mtDNA mutation	Patient
1	C9099A mutation (Ile to Met)	POAG (Male)
2	T9101G mutation (Ile to Ser)	POAG (Female)
3	T9101C mutation (Ile to Thr)	POAG (Female)
4	G9804A mutation (Ala to Thr)	POAG (Male)
5	G9804A mutation (Ala to Thr)	NTG (Female)
6	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 80%	POAG (Female)
7	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 15%	NTG (Male)

As described above, we found 5 mtDNA mutations including 2 novel mtDNA mutations in glaucoma patients. These results indicated that mtDNA mutations is one of the risk factor to develop or progress the glaucoma, and detection of the mtDNA mutations makes possible the early diagnosis and early treatment of glaucoma.

15 Example 3 Gene polymorphisms of the renin-angiotensin aldosterone system associate with risk for developing primary open-angle glaucoma and normal-tension glaucoma

Purpose: Multiple environmental and genetic factors may be involved in pathogenesis of glaucoma. To predict genetic risk of glaucoma, an association study in gene polymorphisms of the renin-angiotensin-aldosterone (R-A-A) system was performed.

#### MATERIALS and METHODS

##### Patients and Control study subjects

A total of 551 blood samples were collected at seven institutes in Japan. They were 162 POAG patients, 193 NTG patients, and 196 normal subjects, and none of the subjects was related to others in this study.

The average age at examination was  $58.8 \pm 13.7$  years in NTG,  $62.0 \pm 15.4$  years in POAG, and  $71.2 \pm 10.4$  years in normal subjects. The average age of the normal control subjects is significantly higher than NTG patients ( $p < 0.001$ ) or POAG patients ( $p < 0.001$ ), respectively. This could reduce the possibility that a subset will eventually develop glaucoma. The familial history was recorded in 66 (34.2%) out of 127 NTG patients and 49 (30.2%) out of 113 POAG patients. Male patients were 89 (46.1%) in NTG and 87 (53.7%) in POAG, and 77 (39.3%) in normal subjects.

One hundred ninety-six Japanese control samples were obtained from individuals who had no known eye abnormalities except cataract. These subjects were older than 40 years with IOP below 21 mmHg, no glaucomatous disc change, and no family

history of glaucoma.

#### Genotyping

Seven genes and 10 polymorphisms in the R-A-A system were determined for each subject with glaucoma or normal Japanese control with renin (REN) I8-83G>A, angiotensin II type 1 receptor (AT1R) 1166A>C, -521C>T, -713T>G, angiotensin II type 2 receptor (AT2R) 3123C>A, cytochrome P45011B1 (CYP11B1) -344T>C, and chymase (CYM) 3123C>A, were identified using by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). The angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion (I/D) was determined only by PCR and agarose gel electrophoresis. To avoid the false determination of ACE/ID polymorphism, I allele specific amplification was carried out following the protocol of Lindpaintner et al (N Engl J Med 1995; 332: 706-711). Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol-chloroform extraction. The primer sets and restriction enzymes used were listed in Table 6.

20

25

Table 6. Primer pair sequences used for PCR amplification and restriction enzymes of polymorphic sites in renin angiotensin system

Gene	Polymorphism	Primer sequences	Annealing temp	Product size	Restriction enzyme	Digested products
REN	I8-83G>A	TGAGGTTTCGAGTCGGCCCCCT TCGCCAAACATGGCCACACAT	68°C	250bp	MboI	G: 250bp A: 171+79bp
5	ACE	I/D 1st step GGCCTGCAGGTGTCTCAGCATGT GGATGGCTCTCCCCGCTTGTCTC	63°C	D: 319bp I: 597bp		
		2nd step TGGCAGCAGAGCGCCGCCACTAC TCGCCAGCCCCCTCCCATGCCATAA	67°C	D/D: no product I: 335bp		
	AT1	1166A>C GAGGTTGAGTGACATGTTGAAAC CGTCATCTGTCTAATGC AAAATGT	60°C	253bp	DdeI	A: 253bp C: 155+98bp
		-521C>T CGTGATGTCTTTATCTGGTTTGT CGAACTTTGGTAATACAGTTGTGG	60°C	270bp	SspI	C: 270bp T: 144+126bp
		-713T>G AAACTACAGTCAGCCTACTCACCT TTCTTCACAAACTCTTCCAA	55°C	292bp	HinfI	T: 170+122bp G: 292bp
10	AT2	3123C>A GGATTGAGTTTCTCTTTGAA GCATAGGAGTATGATTTAATC	53°C	340bp	AluI	C: 340bp A: 227+113bp
	CYP11B1	-344C>T CAGGAGGGATGAGCAGGCAGAGCACAG CTCACCCAGGAACCTGCTCTGGAAACATA	63°C	404 bp	HaeIII	C: 333bp + 71bp T: 404 bp
	CMA	-1903A>G GGAAATGTGAGCAGATAGTCAGTC AATCCGGAGCTGGAGAAGCTCTTCTC	51°C	285bp	BstXI	A: 285bp G: 195+90bp

The genotyping angiotensinogen (AGT) T174M, M235T was determined using by Invader assay®.

## RESULTS

### 15 Genotype distribution of R-A-A system in Japanese population

Of 10 polymorphisms in R-A-A system, three showed a significantly difference in frequencies of genotypes: REN/I8-83G>A for POAG, AT1/-713T>G for POAG, and AT2/3123C>A for NTG (Table 7). A 3123C>A polymorphism was associated with  
20 only female patients with NTG.

A frequency of homozygous G genotype (GG) in AT1/-713T>G polymorphism was significantly higher ( $p=0.04$  for TT+TG v GG) in POAG patients (4.2%) than in controls (0.5%). And a frequency of homozygous A genotype (AA) in REN/I8-83G>A polymorphism was  
25 significantly lower ( $p=0.031$  for GG+GA v AA) in POAG patients

(0.7%) than in controls (5.5%). A frequency of CA+AA genotypes in AT2/3123C>A polymorphism was significantly higher ( $p=0.011$  for CC v CA+AA) in female patients with NTG (70.8%) than in female controls (55.0%).

5 Table 7. Association between glaucoma (POAG and NTG) and gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system.

Gene	Gene Polymorphism	Genotype Frequency		P	
		GG+GA	AA		
10 Renin	I8-83G>A	POAG (n=153)	152 (99.3%)	1 (0.7%)	0.031
		NTG (n=185)	177 (95.7%)	8 (4.3%)	
		Control (n=183)	173 (94.5%)	10 (5.5%)	
15 AT1	-713T>G	TT+TG	GG	P	0.04
		POAG (n=165)	158 (95.8%)	7 (4.2%)	
		NTG (n=208)	208 (100%)	0 (0.0%)	
		Control (n=198)	197 (99.5%)	1 (0.5%)	
AT2	3123C>A (Female)	CC	CA+AA	P	0.011
		POAG (n=79)	34 (43.0%)	45 (56.0%)	
		NTG (n=120)	35 (29.2%)	85 (70.8%)	
		Control (n=111)	54 (45.0%)	66 (55.0%)	

20 Association between two promoter polymorphisms in AT1 in POAG patients

A frequency of POAG carriers with combined homozygous -521T and homozygous -713G (4.2%) was significantly higher ( $p=0.011$ ) than that of normals (0%) (Table 8). Only POAG patients, neither NTG nor normal subjects, had this genotype.

Table 8. Distribution of genotypes of AT1 -521T allele and -713G allele

Group	A	B	P
POAG (n=165)	7 (4.2%)	158 (95.8%)	0.011
NTG (n=208)	0 (0.0%)	208 (100.0%)	
Control (N=198)	0 (0.0%)	198 (100.0%)	

A: Subjects with two -521 alleles and two -713G alleles

B: Subjects not satisfying the criteria for Group A.

These results indicated that gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system is one of important genetic risk factors for development of glaucoma. Detection of the REN/I8-83G>A and AT1/-731T>G polymorphisms make possible the early diagnosis and early treatment of POAG. Especially, specific genotype of combined homozygous -521T and homozygous -713G in the AT1 gene is useful for the early diagnosis of POAG. Detection of the AT2/3123C>A polymorphisms make possible the early diagnosis and early treatment of female patient with NTG.

Example 4 Gene polymorphisms of the Endothelin gene associate with risk for developing normal-tension glaucoma

#### Methods

#### Patients

A total of 605 blood samples were collected. There were

178 POAG patients, 214 NTG patients, and 213 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study. Patients were considered to have POAG if they had a normal open-angle, a cup-disc ratio greater than 0.7 with typical  
5 glaucomatous visual field loss on either Goldmann or Humphrey perimetry, and the absence of ocular, rhinologic, neurological or systemic disorders which might be responsible for the optic nerve damage. Patients with NTG had an IOP of 21 mmHg or lower. Patients with exfoliative glaucoma, pigmentary glaucoma, and  
10 corticosteroid-induced glaucoma were excluded. Control samples were obtained from Japanese subjects who had no known eye abnormalities except for cataracts. These subjects had IOPs below 21 mm Hg, had normal optic discs, and no family history of glaucoma.

15 Detection of G/T polymorphism of endothelin (ET) gene by Invader assay

DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods of phenol-chloroform extraction, and G/T polymorphism (Lys/lys, Lys/Asn and Asn/Asn) at codon 198 in  
20 exon 5 of ET gene was determined by the Invader® assay. The primary probes (wild and mutant probes) and Invader® oligonucleotides (Invader® probe) used to detect the G/T polymorphism of ET gene are shown in Table 9.



Table 9.

Mutation	nucleotide change	Target	Probe	Sequence	T <sub>m</sub>	Dye
EDN Ex5 GT	G to T	Sense	Wild	cgcgccgaggCTTGCCTTTCAGCTTGG	64.6	FAM
			Mutant	acggacgcggagATTGCCTTTCAGCTTGG	64.0	RED
			Invader	GTTGTGGGTACATAACGCTCTCTGGAGGGT	76.9	

5           Invader® assay FRET-detection 96-well plates (Third Wave Technologies, Inc, Madison, WI) contains the generic components of an Invader® assay (Cleavase® enzyme VIII, FRET probes, MOPS buffer, and polyethylene glycol) dried in each of the individual wells. The detail method was described

10 previously. In brief, 8 µl of the primary probe/Invader®/mixture and total DNA (10 ng) samples were added to each well of a 96-well plate, and were denatured by incubation at 95°C for 10 min. After 15 µl of mineral oil (Sigma, St. Louis, MO) was overlaid on all reaction wells, the plate

15 was incubated isothermally at 63° C for 2 hours in a PTC-100 thermal cycler (MJ Research, Waltham, MA) and then kept at 4° C until fluorescence measurements. The fluorescence intensities were measured on a CytoFlour 4000 fluorescence plate reader (Applied Biosystems, Foster City, CA) with

20 excitation at 485 nm/20 nm (wavelength/ bandwidth) and emission at 530 nm/25 nm for FAM dye; excitation at 560 nm/20 nm and emission at 620 nm/40 nm for Redmond RED (RED) dye. Each sample was tested in duplicate in the same plate and two fluorescence measurements were performed in each plate. Thus,

25 four measurements were obtained for each sample and they were

averaged.

#### Results

The genotype frequencies of G/T polymorphism (Lys/Lys, Lys/Asn and Asn/Asn) at codon 198 in exon 5 of ET gene are presented in Table 10.

Table 10. The genotype frequency at codon 198 in exon 5 of ET gene

Group	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p
		Lys/Lys	Lys/Asn	Asn/Asn		Lys/Lys	Lys/Asn + Asn/Asn	
Control	213	94 (44.1%)	93 (43.7%)	26 (12.2%)		94 (44.1%)	119 (55.9%)	
NTG	214	120 (56.1%)	72 (33.6%)	22 (10.3%)	0.046	120 (56.1%)	94 (43.9%)	0.014
POAG	178	82 (46.1%)	77 (43.3%)	19 (10.7%)		82 (46.1%)	96 (53.9%)	

These results indicated that Lys/Lys homozygote of ET-1 gene at codon 198 in exon 5 is one of the risk factor to develop or progress the NTG, and detection of the Lys/Lys homozygote makes possible the early diagnosis and early treatment of NTG.

Example 5 Novel MYOC Gene Mutation, Phe369Leu, in Japanese Patients with Primary Open-angle Glaucoma Detected by Denaturing High-performance Liquid Chromatography

Purpose: To screen for mutations in the MYOC gene in Japanese patients with primary open-angle glaucoma (POAG) using denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC).

## Materials and Methods

### Patients

Blood samples were collected from 171 POAG patients and 100 normal subjects at seven Japanese medical institutions.

5 The subjects were unrelated, and their mean age at the time of examination was  $55.1 \pm 16.0$  ( $\pm$  standard deviation) years for the patients with POAG and  $70.5 \pm 10.6$  years for the normal subjects. We purposely selected older control subjects to reduce the probability that a subset of them would develop  
10 glaucoma.

A detailed family history was obtained by interviews in 55 POAG patients (32.2%). There were 91 men (53.2%) in the POAG patients, and 41 men (41.0%) in the normal subjects.

### DNA Extraction and PCR Conditions

15 Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by standard methods. The seven exonic regions of the *MYOC* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets listed in Table 11. For high-throughput analysis of the patients, samples from three patients were  
20 pooled. The PCR reaction was performed with a thermal cycler (iCycler; Bio Rad, Hercules, CA) in a total volume of 25  $\mu$ l. The PCR conditions were: denaturation at 95° C for 9 min; followed by 35 cycles at 95° C for 1 min; 58° C for 30 sec (Table 1); and 72° C for 1.5 min; a final extension step was then carried  
25 out at 72° C for 7 min. For heteroduplex formation, each PCR

product (25 µl) was denatured at 95° C for 5 min and gradually cooled to 25° C.

For analyses of a few samples, each of seven exonic regions was amplified simultaneously by PCR in a 96-well plate (96-well Multiplate, MLP-9601; MJ Research, Waltham, MA). Seven wells were used for each patient. Primer sets were designed to be effective using a single annealing temperature of 58° C (Table 11).

Table 11. Primer sequences, product size, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon		Primer sequences (5' to 3')	Product size (bp)	PCR T <sub>m</sub> (°C)	DHPLC T <sub>m</sub> (°C)
15	1A	F AGC ACA GCA GAG CTT TCC AGA GGA R CTC CAG GTC TAA GCG TTG G	302	58.0	61.8
	1B	F CAG GCC ATG TCA GTC ATC CA R TCT CAT TTT CTT GCG TTA GTC	298	58.0	61.2, 64.5
	1C	F GAA ACC CAA ACC AGA GAG R ATA TCA CCT GCT GAA CTC AGA GTC	255	58.0	61.0, 63.5
	2A	F CCT CAA CAT AGT CAA TCC TTG GGC R ACA TGA ATA AAG ACC ATG TGG GOA	245	58.0	56.3, 59.3
	3A	F GAT TAT GGA TTA AGT GGT GGT TCG R TGT CTC GGT ATT CAG CTC AT	375	58.0	58.3, 61.3, 62.3
	3B	F CAT ACT GCC TAG GCC ACT GGA R ATY GGC GAC TGA CTG CTT AG	337	58.0	60.9, 61.4
	3C	F GAA TCT GGA ACT CGA ACA AA R CTG AGC ATC TCG TTC TGC CAT	333	58.0	59.7, 61.7

## Denaturing HPLC Analysis

For high-throughput analysis, a 25 µl volume of PCR products from the three patients was automatically injected into the chromatograph for analysis using the WAVE® System for DHPLC analysis (Transgenomic, Omaha, NE). The DHPLC melting temperatures are listed in Table 1. For analysis of a small

number of samples, following 96-well-plate PCR, the plate was next placed in a WAVE® System programmed to automatically analyze each well at two to three melting temperatures. Approximately 3 hrs was sufficient time to analyze one  
5 individual's sample.

When abnormal chromatographic patterns were detected in the pooled samples by the high-throughput protocol, the sample was reanalyzed individually in the WAVE® System. The PCR product that showed the abnormal chromatographic pattern  
10 was then sequenced.

#### Direct DNA Sequencing

For direct sequencing, PCR products were purified with a QIA Quick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA) to remove unused primers and precursors. The PCR products were  
15 directly sequenced with the same forward and reverse PCR amplification primers on an ABI310 automated sequencer using BigDye chemistry according to the manufacturer's recommended protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA).

#### Results

##### 20 Screening of Pools of DNA in 171 Patients

Four DHPLC tracing patterns in the Exon3C region were shown in Figure 1. The upper most pattern (A) has a normal appearance, while the middle pattern (B) showed a broad  
shoulder, and the lower patterns (C and D) had a characteristic  
25 double peak pattern indicative of sequence variations in this

region. Sequencing analysis of samples B, C, and D revealed Thr448Pro, Pro481Ser, and Ala488Ala mutations (Table 12).

Four glaucoma-causing mutations were identified in 5 (2.9%) of 171 patients with POAG. In addition, eight polymorphisms and five synonymous codon changes were identified (Table 12). One novel missense mutation, Phe369Leu detected in exon 3 (Figure 2) was not present in 100 normal Japanese subjects. The three other missense mutations, Ile360Asn, Ala363Thr, and Thr448Pro have been reported in 10 Japanese patients with POAG.

Table 12. MYOC mutations and polymorphisms in patients with POAG and controls

	Exon	Sequence change	Amino acid change	Frequency patients	Frequency controls	
15	Mutations	3	c.1079T>A	Ile360Asn	1/171	0/100
		3	c.1087G>A	Ala363Thr	2/171	0/100
		3	c.1105T>C	Phe369Leu*	1/171	0/100
		3	c.1342A>C	Thr448Pro	1/171	0/100
20	Polymorphisms	1	c.34G>C	Gly12Arg	1/171	2/100
		1	c.57G>T	Gln19His	1/171	1/100
		1	c.136C>T	Arg46Stop	1/171	1/100
		1	c.210C>T	Val70Val <sup>†</sup>	2/171	0/100
		1	c.227G>A	Arg76Lys	14/171	9/100
		1	c.369C>T	Thr123Thr	1/171	0/100
		1	c.473G>A	Arg158Gln	1/171	1/100
		2	c.611C>T	Thr204Met	0/171	1/100
		2	c.624C>G	Asp208Glu	5/171	2/100
		3	c.864C>T	Ile288Ile	1/171	0/100
		3	c.1110G>A	Pro370Pro	0/171	1/100
		3	c.1441C>T	Pro481Ser	1/171	0/100
		3	c.1464C>T	Ala488Ala	3/171	1/100

\* Novel myocilin mutation; † novel myocilin polymorphism.

#### Screening of Individual Patients by Plate PCR followed by DHPLC

A DHPLC tracing from a patient with POAG is shown in Figure 3. In the exon3B region, an abnormal tracing indicative of sequence variation can be seen, which proved to represent a Phe369Leu mutation on direct sequencing.

#### Example 6 Variants in Optineurin Gene and their Association with Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Polymorphisms in Japanese Patients with Glaucoma

10

**Purpose:** To investigate sequence variations in the optineurin (OPTN) gene and their association with TNF- $\alpha$  polymorphism in Japanese patients with glaucoma.

#### SUBJECTS AND METHODS

##### 15 Patients and Control Subjects

A total of 629 blood samples were collected at seven institutions in Japan. There were 194 POAG patients, 217 NTG patients, and 218 normal controls, and none of the subjects was related to others in this study.

##### 20 DNA Extraction and PCR Conditions

Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes by phenol-chloroform extraction. The 13 exonic coding regions of the OPTN gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the primer sets listed in Table 13.

25 A 20-base GC-clamp was attached to some of the forward primers

to detect mutations in the higher melting temperature domain by DHPLC analysis. In high-throughput analysis, samples from three patients were pooled. PCR was performed with a thermal cycler (iCycler, Bio-Rad; Hercules, CA) in a total volume of 20  $\mu$ l containing; 45 ng of genomic DNA, 2  $\mu$ l GeneAmp 10x PCR buffer II, 2  $\mu$ l of GeneAmp dNTP mix with a 2.0 mM concentration of each dNTP, 2.4  $\mu$ l of a 25 mM  $MgCl_2$  solution; 4 pmol of each primer, and 0.1 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions were;

5 20  $\mu$ l containing; 45 ng of genomic DNA, 2  $\mu$ l GeneAmp 10x PCR buffer II, 2  $\mu$ l of GeneAmp dNTP mix with a 2.0 mM concentration of each dNTP, 2.4  $\mu$ l of a 25 mM  $MgCl_2$  solution; 4 pmol of each primer, and 0.1 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA). PCR conditions were;

10 denaturation at 95° C for 9 min, followed by 35 cycles at 95° C for 1 min, 55° to 60° C for 30 sec (Table 13), and 72° C for 1 min and 30 sec, and a final extension step at 72° C for 7 min.



Table 13. Primer sequences, PCR product sizes, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon		Primer Sequences (5' to 3')	PCR product size (bp)	PCR T <sub>m</sub> (°C)	DHPLC T <sub>m</sub> (°C)
5	4	F CCAGTGGGTTTGTGGGACTCC R AAAGGGATGGCATTCTTGCA	317	60	61.7
	5	F GTCCACTTTCCTGGTGTGTGACT R CAACATCACAATGGATCG	277	55	58.7
	6	F AGCCTTAGTTTGATCTGTTCATTCA R GTTTCATCTTTCCAGGGGAGGCT	293	60	57.0, 62.5
	7	F GC-clamp AATCCCTTGCATTTCTGTTTT R GTGACAAGCACCCAGTGACGA	188	55	59.4, 61.4, 62.4
	8	F GC-clamp GGTTACTCTCTTCTTAGTCTTTGGA R GGGTGAAGTGTATGGTATCTTAATT	320	57	54.6, 58.5
10	9	F GC-clamp GCTATTTCTCTTAAAGCCAAAGAGA R CAGTGGCTGGACTACTCTCGT	242	55	57.4, 59.4
	10	F GC-clamp GTCAGATGATAATTGTACAGATAT R AATGTATATTTCAAAGGAGGATAAA	227	55	57.8, 59.8
	11	F CCACTGCGACGTAAAGGAGCA R CAAATCCGAATTCCAATCTGTATAA	286	60	57.5, 59.5
	12	F GC-clamp GGTTGGGAGGCAAGACTATAAGTT R TTCTGTTCACTACTAGGCTATGGAA	233	60	55.5, 56.5
	13	F CAGGCAGAATTATTTCAAAACCAT R CGAGAATACAGTCAGGGCTGG	264	60	58.9, 61.9
15	14	F GCACTACCTCCTCATCGCATAAACA R GGCCATGCTGATGTGAGCTCT	260	60	56.7, 59.7
	15	F GC-clamp GGACTGTCTGCTCAGTGTGTGCA R GGTGCCTTGATTTGGAATCCA	282	60	56.0, 59.0, 61.0
	16	F GC-clamp CACAAGTGCCTGCAAAATGGAAGT R GAGGCAAAATATTTGAGTGAAAACA	294	60	61.7
		GC-clamp : CGCCCGCCGCCGCCGCCGCCG			

#### Denaturing HPLC Analysis

20 DHPLC analysis was performed using the WAVE<sup>®</sup> SYSTEMS (Transgenomic, Omaha, NE). For heteroduplex formation, products of each PCR (20 µl) were denatured at 95° C for 5 min and gradually cooled to 25° C. The annealed PCR products from the three mixed samples were automatically injected into a

25 DNASep<sup>®</sup> cartridge (Transgenomic, Omaha, NE).

Buffer A (Transgenomic, Omaha, NE) was made up of 0.1 M triethylammonium acetate (TEAA), and Buffer B of 0.1 M TEAA and 25% acetonitrile. Analysis was carried out at a flow rate of 0.9 ml/min and the Buffer B gradient increased by 2%/min for 4.5 min. Elution of DNA fragments from the cartridge was detected by absorbance at 260 nm. The temperatures used for the analysis were selected according to the sequences of the DNA fragments. The WAVEMAKER software (v.4.1, Transgenomic, Omaha, NE) predicted the melting behavior of the DNA fragments at various temperatures. The predicted melting domains within the DNA fragment determined the temperatures for the DHPLC analysis (Table 13). When abnormal chromatographic patterns were detected in a pool of three samples, each of the three samples was re-analyzed individually in the WAVE<sup>®</sup> SYSTEM. Then, the PCR product that showed an abnormal chromatographic pattern was sequenced.

#### Direct DNA Sequencing

To detect mutations by direct sequencing, the PCR products were first purified with the QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, Valenica, CA, USA) to remove unreacted primers and precursors. The sequencing reactions were then performed using the ABI PRISM BigDye Terminator (v.3.1) Cycle Sequencing Kit, according to the manufacturer's protocol (Applied Biosystems). The data were collected by the ABI PRISM 310 Genetic Analyzer and analyzed by the ABI PRISM

sequencing analysis program (v.3.7).

**Genotyping OPTN c.412G>A (Thr34Thr) Polymorphism**

The G to A substitution at position c.412 in exon 4 of the *OPTN* gene was detected by using restriction enzyme, *HpyCH<sub>4</sub>IV* (New England BioLabs, Beverly, MA), with the same primers listed in Table 13 for the DHPLC analysis. The G allele sequence was cut into two fragments (188 bp + 129 bp) by *HpyCH<sub>4</sub>IV*, while the A allele sequence remained intact (317 bp).

**Genotyping OPTN c.603T>A (Met98Lys) Polymorphism**

The T to A substitution at position c.603 in exon 5 of the *OPTN* gene was detected by restriction enzyme, *Stu I* (TaKaRa, Shiga, Japan), using the same primers as for the DHPLC analysis (Table 1). The A allele sequence was cut into two fragments (175 bp + 102 bp) by *Stu I*, while the T allele sequence remained intact (277 bp). The polymorphism was confirmed by restriction-enzyme assay and the chromatographic pattern of DHPLC.

**Genotyping OPTN c.1944G>A (Arg545Gln) Polymorphism**

The G to A substitution at position c.1944 in exon 16 of the *OPTN* gene was analyzed by the Invader assay provided by the Research Department of R&D Center, BML (Saitama, Japan). The polymorphism was confirmed by Invader® assay and by the chromatographic pattern of DHPLC.

**Genotyping TNF- $\alpha$  -308G>A Polymorphism**

Genotyping the -308G>A polymorphism in the TNF- $\alpha$  promoter region was performed by using restriction enzyme *NcoI*

(New England BioLabs, Beverly, MA), with the forward primer, 5'-AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3', and the reverse primer, 5'-GTAGTGGGCCCTGCACCTTCT-3'. The forward primer contained one nucleotide mismatch (bold and underlined), which allowed the use of the restriction enzyme. The G allele sequence was cut into two fragments (192 bp + 20 bp) by *NcoI* while the A allele sequence remained intact (212 bp).

#### Genotyping TNF- $\alpha$ -857C>T Polymorphism

Genotyping the -857C>T polymorphism in the TNF- $\alpha$  promoter region was performed by using restriction enzyme *HincII* (TaKaRa, Shiga, Japan), with the forward primer, 5'-AAGTCGAGTATGGGGACCCCCGTTAA-3', and the reverse primer, 5'-CCCCAGTGTGTGGCCATATCTTCTT-3'. The forward primer contained one nucleotide mismatch (bold and underlined), which allowed the use of the restriction enzyme. The C allele sequence was cut into two fragments (106 bp + 25 bp) by *HincII*, while the T allele sequence remained intact (131 bp). Transcriptional activity of the -857T allele was significantly greater than that of -857C allele.

#### 20 Genotyping TNF- $\alpha$ -863C>A Polymorphism

Genotyping the -863C>A polymorphism in the TNF- $\alpha$  promoter region was done by using restriction enzyme *EcoNI* (New England BioLabs, Beverly, MA) with the forward primer, 5'-GCTGAGAAGATGAAGGAAAAGTC-3', and the reverse primer, 25 5'-CCTCTACATGGCCCTGTCCT-3'. The reverse primer contained one

nucleotide mismatch (**bold and underlined**), which allowed the use of the restriction enzyme. The C allele sequence was cut into two fragments (183 bp +23 bp) by *EcoNI*, while the A allele sequence remained intact (206 bp). Transcriptional activity of the -863A allele was significantly greater than that of -863C allele.

#### Statistical Analyses

The frequencies of the genotypes and alleles in patients and controls were compared with the chi-square test and Fisher's exact test. The odds ratio and 95% confidence intervals (CI) also were calculated. The Hardy-Weinberg equilibrium for the observed frequencies was also calculated. The clinical features were analyzed for differences associated with the genotypes using unpaired t test. Statistical analysis was performed with StatMate III (ATMS, Tokyo, Japan). A p value of <0.05 was considered to be significant.

#### RESULTS

##### OPTN Variants in Japanese Subjects

A total of 629 Japanese subjects were studied, and the results are presented in Table 14.

Table 14. OPTN variants observed in glaucoma patients and control subjects

	Location	Sequence Changes	Codon Changes	Frequency in Subjects (%)		
				POAG	NTG	Control
5	Exon 4	c.386C>G	His26Asp	1 / 201 (0.5)	0 / 232 (0)	0 / 218 (0)
	Exon 4	c.449-451delCTC	Leu47del	0 / 201 (0)	0 / 232 (0)	1 / 218 (0.5)
	Exon 5	c.603T>A	Met98Lys	33 / 201 (16.4)	50 / 232 (21.6)	36 / 218 (16.5)
	Exon 16	c.1944G>A	Arg545Gln	14 / 192 (7.3)	15 / 222 (6.8)	11 / 214 (5.1)
	Exon 4	c.412G>A	Thr34Thr	69 / 201 (34.3)	74 / 232 (31.9)	52 / 218 (23.9)
	Exon 4	c.421G>A	Pro37Pro	0 / 201 (0)	1 / 232 (0.4)	0 / 218 (0)
	Exon 4	c.457C>T	Thr49Thr	2 / 201 (1)	0 / 232 (0)	0 / 218 (0)
	Exon 16	c.2023C>T	His571His	0 / 162 (0)	0 / 193 (0)	2 / 196 (1.0)
	Intron 4	c.476+15C>A		0 / 201 (0)	0 / 232 (0)	1 / 218 (0.5)
	Intron 6	c.863-10G>A *		N/C†	N/C	N/C
10	Intron 6	c.863-5C>T *		N/C	N/C	N/C
	Intron 8	c.1089+20G>A		4 / 133 (3.0)	11 / 172 (6.4)	4 / 126 (3.2)
	Intron 9	c.1192+19C>T		0 / 133 (0)	4 / 172 (2.3)	3 / 130 (2.3)
	Intron 11	c.1458+28G>C		1 / 133 (0.8)	4 / 172 (2.3)	0 / 157 (0)
	Intron 15	c.1922+10G>A		2 / 133 (1.5)	4 / 172 (2.3)	1 / 157 (0.6)
	Intron 15	c.1922+12G>C		0 / 133 (0)	1 / 172 (0.6)	0 / 157 (0)
	Intron 15	c.1923-48C>A *		N/C	N/C	N/C

\* Sequence variation was found by direct sequencing analysis.

† Not checked

15           Seventeen sequence changes were identified in the  
glaucoma patients and control subjects. Among these, three  
were missense changes, one was a deletion of one amino acid  
residue, four were synonymous codon changes, and nine were  
changes in noncoding sequences. One possible disease  
causing-mutation, His26Asp, was identified in one POAG proband  
20 and was not present in the 218 normal Japanese controls. Her  
brother aged 55 harbored the mutation and was diagnosed as NTG.  
Her brother's daughter aged 23 also had the mutation and showed  
cupping of the optic nerve head with a cup/disk ratio of 0.7  
25 with no sign of visual field defect by Humphrey perimetry .

A deletion of Leu47 (3-bp deletion, CTC) was found in 1 control. A Met98Lys was identified in 33 POAG patients, 48 NTG patients, and 36 controls, and an Arg545Gln was identified in 11 POAG patients, 15 NTG patients, and 11 controls.

5 Four synonymous nucleotide substitutions, c.412G>A (Thr34Thr), c.421G>A (Pro37Pro), c.457C>T (Thr49Thr), and c.2023C>T (His571His) were found. The Thr34Thr substitution was present in 69 (35.6%) POAG patients, 69 (31.8%) NTG patients, and 52 (23.9%) controls, and the Pro37Pro was found in 1 NTG  
10 patient. The Thr49Thr was identified in 1 POAG patient, and the His571His was present in 2 controls.

#### Distribution of OPTN Variants in Japanese Subjects

The Thr34Thr (c.412G>A) polymorphism was significantly associated with POAG and NTG (Table 15). A significant  
15 association was found in patients with POAG ( $P = 0.009$  in genotype frequency: G/G vs G/A+A/A, and  $P = 0.003$  in allele frequency). No significant difference was detected between glaucoma patients and controls in either genotype or allele frequency for the Met98Lys (c.603T>A) or the Arg545Gln  
20 (c.1944G>A) polymorphisms. However, the Met98Lys polymorphism had a higher tendency to be associated with NTG than with POAG. The observed genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium.

25

Table 15. Genotype distribution and allele frequency of optineurin gene polymorphisms in glaucoma patients and controls

c.412G>A (Thr34Thr)																
Phenotype	n	Genotype frequency (%)				Genotype frequency (%)				Genotype frequency (%)				Allele frequency (%)		
		G/G	G/A	A/A	P value*	G/G	G/A+A/A	P value*	G/G+G/A	A/A	P value†	G	A	P value*		
POAG	194	125 (64.4)	81 (31.4)	8 (4.1)	0.011 ‡	125 (64.4)	69 (35.6)	0.009 §	188 (95.8)	8 (4.1)	0.051	311 (80.2)	77 (19.8)	0.003 §		
NTG	217	148 (68.2)	62 (28.6)	7 (3.2)	0.078	148 (68.2)	69 (31.8)	0.064	210 (96.8)	7 (3.2)	0.105	358 (82.5)	78 (17.5)	0.034 ‡		
Control	218	166 (76.1)	50 (22.9)	2 (1.0)		166 (76.1)	52 (23.9)		216 (99.0)	2 (1.0)		362 (87.6)	54 (12.4)			

c.603T>A (Met98Lys)																
Phenotype	n	Genotype frequency (%)				Genotype frequency (%)				Genotype frequency (%)				Allele frequency (%)		
		T/T	T/A	A/A	P value*	T/T	T/A+A/A	P value*	T/T+T/A	A/A	P value†	T	A	P value*		
POAG	184	161 (83.0)	32 (18.5)	1 (0.5)	0.990	161 (83.0)	33 (17.0)	0.893	193 (99.5)	1 (0.5)	1	354 (91.2)	34 (8.8)	0.888		
NTG	217	169 (77.9)	43 (19.8)	5 (2.3)	0.133	169 (77.9)	48 (22.1)	0.139	212 (97.7)	5 (2.3)	0.122	381 (87.8)	53 (12.2)	0.071		
Control	218	182 (83.5)	35 (16.0)	1 (0.5)		182 (83.5)	36 (16.5)		217 (99.5)	1 (0.5)		399 (91.5)	37 (8.5)			

\*

†

‡

§

P value for  $\chi^2$  test.

P value for Fisher's exact test.

P<0.05

P<0.01

Three clinical characteristics of the glaucoma patients, viz., age at diagnosis, IOP at diagnosis, and visual field score at diagnosis, were examined for association with c.412G>A (Thr34Thr) or c.603T>A (Met98Lys) polymorphisms (Table 16). The glaucoma patients did not show an association with the clinical characteristics with the c.412G>A polymorphism. POAG patients with the G/A+A/A genotype (or 412A carriers) tended to have more advanced visual field scores than those with the G/G genotype (or non-412A carriers;  $P = 0.093$ ). POAG patients with the 603T>A polymorphism showed a weak association with age at diagnosis ( $P = 0.046$ ).



Table 16 Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to *OPTN* genotypes

**c.412G>A (Thr34Thr)**

	Phenotype Variable	G/G	G/A+A/A	P value*
5	POAG Age at diagnosis (ys)	58.1 ± 11.8 (n = 123)	58.8 ± 12.6 (n = 69)	0.663
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.0 ± 6.5 (n = 112)	26.1 ± 5.0 (n = 60)	0.360
	Visual field score at diagnosis	3.0 ± 0.9 (n = 125)	3.2 ± 0.9 (n = 69)	0.093
	NTG Age at diagnosis (ys)	58.7 ± 11.7 (n = 148)	56.6 ± 11.2 (n = 69)	0.206
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.4 ± 2.6 (n = 139)	16.6 ± 2.2 (n = 67)	0.848
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 148)	2.7 ± 0.7 (n = 69)	0.135

**c.603T>A (Met98Lys)**

	Phenotype Variable	T/T	T/A+A/A	P value*
10	POAG Age at diagnosis (ys)	57.6 ± 11.9 (n = 159)	62.2 ± 12.4 (n = 33)	0.046†
	IOP at diagnosis (mm Hg)	26.8 ± 5.8 (n = 143)	26.5 ± 7.1 (n = 29)	0.931
	Visual field score at diagnosis	3.1 ± 0.9 (n = 161)	3.2 ± 0.9 (n = 33)	0.280
	NTG Age at diagnosis (ys)	58.4 ± 11.6 (n = 169)	56.6 ± 11.6 (n = 48)	0.304
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.4 ± 2.4 (n = 160)	16.8 ± 2.6 (n = 46)	0.270
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 169)	2.8 ± 0.6 (n = 48)	0.318

\* P values for Mann-Whitney U test.

† P < 0.05

**Association between *OPTN* Polymorphism and *TNF-α* Polymorphism in Glaucoma Patients**

15 No significant difference in genotype or allele frequency was noted between patients and controls for the three polymorphisms of the -308G>A, -857C>T or -863C>A. In addition, the glaucoma patients did not show an association with the clinical characteristics for the three polymorphisms (data not  
20 shown). The observed genotype frequencies were in agreement with those predicted by the Hardy-Weinberg equilibrium.

However, among individuals with the C/T+T/T genotype (or -857T carriers) in the *TNF-α* gene, 44.1 % of POAG patients were G/A+A/A genotypes (or 412A carriers) in the *OPTN* gene compared  
25 to 21.6 % of controls (Table 17). This difference in frequency

was significant ( $P = 0.006$ ). Among individuals with the C/A+A/A genotype (or -863A carriers) in the TNF- $\alpha$  gene, 603A carriers (or Lys98 carriers) in the OPTN gene were significantly associated with POAG as well as NTG ( $P = 0.008$  and 0.027, respectively).

**Table 17** Distribution of optineurin genotypes (c.412G>A and c.603T>A) according to TNF- $\alpha$  genotypes (-857C>T and -863C>A)

**c.412G>A (Thr34Thr)**

Phenotype	-857C>T	C/C (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI	C/T+T/T (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI
	c.412G>A	G/G	G/A + A/A			G/G	G/A + A/A		
POAG		92 (68.1)	43 (31.9)	0.204	1.40 (0.63-2.37)	33 (55.9)	26 (44.1)	0.006‡	2.86 (1.34-6.08)
NTG		97 (65.5)	51 (34.5)	0.077	1.58 (0.95-2.62)	51 (73.9)	18 (26.1)	0.531	1.28 (0.59-2.77)
Control		108 (75.0)	36 (25.0)			58 (78.4)	16 (21.6)		

Phenotype	-863C>A	C/C (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI	C/A+A/A (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI
	c.412G>A	G/G	G/A + A/A			G/G	G/A + A/A		
POAG		91 (84.5)	50 (35.5)	0.017	1.84 (1.11-3.05)	34 (64.2)	19 (35.8)	0.280	1.56 (0.69-3.53)
NTG		110 (69.2)	49 (30.8)	0.114	1.49 (0.91-2.48)	38 (65.5)	20 (34.5)	0.341	1.47 (0.66-3.28)
Control		124 (77.0)	37 (23.0)			42 (73.7)	15 (26.3)		

**c.603T>A (Met98Lys)**

Phenotype	-857C>T	C/C (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI	C/T+T/T (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI
	c.603T>A	T/T	T/A + A/A			T/T	T/A + A/A		
POAG		112 (83.0)	23 (17.0)	0.811	1.08 (0.57-2.03)	49 (83.1)	10 (16.9)	0.925	0.96 (0.39-2.37)
NTG		111 (75.0)	37 (25.0)	0.056	1.75 (0.98-3.13)	58 (84.1)	11 (15.9)	0.795	0.89 (0.37-2.14)
Control		121 (84.0)	23 (16.0)			61 (82.4)	13 (17.6)		

Phenotype	-863C>A	C/C (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI	C/A+A/A (%)		P value*	Odds ratio 95 % CI
	c.603T>A	T/T	T/A + A/A			T/T	T/A + A/A		
POAG		123 (87.2)	18 (12.8)	0.127	0.81 (0.33-1.15)	38 (71.7)	15 (28.3)	0.008‡	4.11 (1.37-12.27)
NTG		125 (78.6)	34 (21.4)	0.636	1.14 (0.66-1.97)	44 (75.9)	14 (24.1)	0.027†	3.31 (1.10-9.91)
Control		130 (80.7)	31 (19.3)			52 (91.2)	5 (8.8)		

\* P values for  $\chi^2$  test.

†  $P < 0.05$

‡  $P < 0.01$

The clinical characteristics of these combined genotypes, such as age at diagnosis, IOP at diagnosis, and

visual field score at diagnosis are shown in Table 18. The POAG patients who were TNF- $\alpha$ /-857T and optineurin/412A carriers had significantly worse ( $P = 0.020$ ) visual field scores than those who were TNF- $\alpha$ /-857T and non-optineurin/412A carriers. However, there was no significant difference in the three clinical features of POAG patients among the four genotypes of combined -857T>A and c.412G>A polymorphisms (Table 6) by one-way ANOVA:  $P = 0.823$  for age at diagnosis;  $P = 0.692$  for IOP at diagnosis; and  $P = 0.152$  for visual field score at diagnosis.

POAG patients who were TNF- $\alpha$ /-863A and optineurin/603A carriers had significantly worse ( $P = 0.026$ ) visual field scores than those who were TNF- $\alpha$ /-863A and non-optineurin/603A carriers. However, there was no significant difference in the visual field score of POAG patients among the four genotypes of combined -863 C >A and -603 T >A polymorphisms (Table 6, one-way ANOVA:  $P = 0.200$ ).

**Table 18 Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to TNF- $\alpha$  genotypes (-857T and -863A) and optineurin genotypes (412A and 603A)**

**c.412G>A (Thr34Thr)**

		(TNF- $\alpha$ genotypes) (OPTN genotypes)	C/T+T/T (-857T carrier)		P value*
			G/G	G/A+A/A	
POAG	Age at diagnosis (ys)	57.1 $\pm$ 10.7 (n = 32)	57.6 $\pm$ 13.1 (n = 26)		0.802
	IOP at diagnosis (mm Hg)	26.4 $\pm$ 6.1 (n = 30)	26.4 $\pm$ 5.5 (n = 20)		0.786
	Visual field score	2.9 $\pm$ 0.9 (n = 33)	3.3 $\pm$ 0.8 (n = 26)		0.020†
NTG	Age at diagnosis (ys)	58.4 $\pm$ 11.1 (n = 51)	59.3 $\pm$ 10.5 (n = 18)		0.790
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.4 $\pm$ 2.6 (n = 46)	16.1 $\pm$ 2.3 (n = 17)		0.520
	Visual field score	2.8 $\pm$ 0.8 (n = 51)	2.6 $\pm$ 0.5 (n = 18)		0.335

**c.603T>A (Met98Lys)**

		(TNF- $\alpha$ genotypes) (OPTN genotypes)	C/A+A/A (-863A carrier)		P value*
			T/T	T/A+A/A	
POAG	Age at diagnosis (ys)	56.3 $\pm$ 10.5 (n = 38)	62.0 $\pm$ 13.8 (n = 15)		0.074
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.9 $\pm$ 6.5 (n = 36)	26.9 $\pm$ 8.7 (n = 14)		0.488
	Visual field score	3.0 $\pm$ 0.8 (n = 38)	3.5 $\pm$ 0.9 (n = 15)		0.026†
NTG	Age at diagnosis (ys)	57.9 $\pm$ 11.4 (n = 44)	56.9 $\pm$ 11.9 (n = 14)		0.579
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.2 $\pm$ 2.4 (n = 40)	16.9 $\pm$ 2.4 (n = 14)		0.364
	Visual field score	2.9 $\pm$ 0.5 (n = 44)	2.7 $\pm$ 0.6 (n = 14)		0.296

\* P values for Mann-Whitney U test.

† P < 0.05

10

20 **Example 7. Correlation between Gene Polymorphism of angiotensin II type 2 receptor and the IOP reducing effect of angiotensin II receptor blocker**

**Methods**

25 **Patients**

X 染色体上に存在する多型であるアンギオテンシン II 受容体 2 (AT2) 遺伝子の塩基番号 3123 位に C (シトシン) を持つ男性 9 名、A (アデニン) を持つ男性 4 名、CC を持つ女性 4 名、CA を持つ女性 4 名に、アンギオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンシレキセチルを経口投与し、投与後 1 から

30 24 時間後の眼圧の推移を測定した。

## RESULTS

薬剤投与後 1 から 24 時間後の眼圧の推移について、Table 19 に示す。

Table 19.

5	内服前 Base Line	眼圧下降量mmHg							遺伝子多型AT2/3123C>A				
		1時間後	2時間後	3時間後	4時間後	5時間後	6時間後	24時間後	男性	男性	女性	女性	
10	0	-2	-1	-3	-2	-1	-1	-1		A			I
	0	-2	-2	0	0	-1	1	1		A			
	0	1	1	0	0	-2	-2	0		A			
	0	0	0	-2	1	0	0	-1	C				
	0	-1	-3	-5	-2	-3	-3	-3	C				II
	0	0	-3	-2	-4	-3	0	0				CA	
	0	-1	-1	-4	-3	-4	-3	1	C				
	0	-2	-4	-4	-4	-4	-5	-2	C				
	0	-2	-3	-3	-2	-2	1	2			CC		
	0	-2	-3	-2	-5	-3	-3	0	C				
15	0	-4	-6	-6	-6	-6	-4	-5				CA	III
	0	-4	-5	-6	-5	-5	-5	-7	C				
	0	-4	-6	-6	-8	-5	-5	-4				CA	
	0	-2	-3	-6	-5	-6	-3	-3	C				
	0	-2	-4	-4	-6	-3	-4	-5				CA	
	0	-4	-8	-6	-7	-6	-6	-2			CC		
	0	-4	-4	-5	-3	-5	-4	-3	C				
	0	-1	-4	-6	-3	-6	-4	0			CC		
	0	-2	-4	-7	-5	-7	-6	-3			CC		
	0	-2	-7	-6	-4	-6	-6	-1	C				
20	0	-2	-7	-6	-4	-6	-6	-1					
	0	-6	-8	-8	-12	-12	-12	-12		A			

I: 眼圧下降無効例

II: 眼圧下降効果+例

III: 眼圧下降効果++例

4例中3例はA

6例中5例はcまたはcc

11例中7例はcまたはcc

すなわちAを持つと眼圧が下がり難く、Cを持つと下がりやすい  
多型はX染色体

男性はcまたはAを持つ

女性はcc、CAまたはAAを持つ

AT2 遺伝子の塩基番号 3123 に A を持つ男性がアンギオテンシン II 受容体拮抗薬であるカンデサルタンシレキセチルを内服すると、75%の割合で眼圧が下がり難かったが、C を持つ男性は 100%の割合で眼圧が低下した。一方、女性の場合、CC を持つ人は 100%の割合で眼圧が低下した。

上記結果より、AT2 遺伝子多型と薬効との間に相関関係があることが示唆された。

Example 8. Correlation between Gene Polymorphism of endothelin and glaucoma

## Methods

POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、エンドセリン関連遺伝子の多型と緑内障との関連について、インベダー法を用い調べた。

## Results

- 5 男性において次の関連が認められた。
- 1) エンドセリンのエキソン 1 の A138insertion/deletion (A138I/D) 多型は、POAG および NTG とともに関連が認められた (Table 20)。
  - 2) エンドセリン受容体 A のプロモーター領域の-231A>G 多型は、NTG (特に最高眼圧が 15mmHg 以下) と関連が認められた (Table 21)。
  - 10 3) エンドセリン受容体 A のエキソン 6 にある His323His (CAC TO CAT) において C>T 多型は、NTG (特に最高眼圧が 15mmHg 以下) と関連が認められた (Table 22)。
  - 4) エンドセリン受容体 B のエキソン 4 にある Leu277Leu において、G>A 多型は、POAG および NTG とともに関連が認められた (Table 23)。
- 15 女性において次の関連が認められた。
- 1) エンドセリンの K198N (Lys198Asn) 多型は、NTG と関連が認められた (Table 24)。
  - 2) エンドセリンのプロモーター領域の-1370T>G 多型は、NTG と関連が認め
  - 20 られた (Table 25)。
  - 3) エンドセリン受容体 A の 3' non-coding region の+70C>G (stop codon から 70 番目) 多型は、POAG と関連が認められた (Table 26)。
  - 4) エンドセリン受容体 A の 3' non-coding region の+1222C>T (stop codon から 1227 番目) 多型が、NTG (眼圧が 16mmHg-21mmHg) と関連が認
  - 25 められた (Table 27)。

Table 20. Endothelin A138I/D (Male)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		I/I	I/D	D/D		I/I	I/D+D/D		I/I+I/D	D/D	
Control	100	4	34	62		4	96		38	62	
POAG	100	3	21	76		3	97		24	76	0.032
NTG	119	1	28	90		1	118		29	90	0.029

Table 21. Endothelin Receptor A -231A>G (Male)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		AA	AG	GG		AA	AG+GG		AA+AG	GG	
Control	100	22	45	33		22	78		67	33	
POAG	100	24	51	25		24	76		75	25	
NTG	119	30	60	29		30	89		90	29	
H-NTG	89	17	45	27		17	72		62	27	
L-NTG	25	12	12	1	0.017	10	15	0.026	22	3	0.025

5 H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: NTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg or less.

Table 22. Endothelin Receptor A H323H C>T His323His (Male)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	100	9	40	51		9	91		49	51	
POAG	100	7	38	55		7	93		45	55	
NTG	119	11	50	58		11	108		61	58	
H-NTG	89	7	32	50		7	82		39	50	
L-NTG	25	4	14	7		4	21		18	7	0.029

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 5 15mmHg or less.

Table 23. Endothelin Receptor B L277L G>A Leu277Leu (Male)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		GG	GA	AA		GG	GA+AA		GG+GA	AA	
Control	100	18	41	41		18	82		59	41	
FOAG	100	26	48	26		26	74		74	26	0.025
NTG	119	26	61	32		26	93		87	32	0.027



Table 24. Endothelin Lys198Asn G>T or K198N (Female)

	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		$\chi^2$ test p
		KK	KN	NN		KK	KN+NN		KK+KN	NN	
Control	124	52	59	13		52	72		111	13	
POAG	76	38	33	5		38	38		71	5	
NTG	131	76	53	13	0.009	76	55	0.010	114	17	

Table 25. Endothelin -1370T>G (Female)

	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		$\chi^2$ test p
		TT	TG	GG		TT	TG+GG		TT+TG	GG	
Control	124	66	56	2		66	58		122	2	
POAG	76	49	24	3		49	27		73	3	
NTG	131	84	47	0	0.013	84	47		123	8	

5 Table 26. Endothelin Receptor A +70C>G (Female)

	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		$\chi^2$ test p
		CC	CG	GG		CC	CG+GG		CC+CG	GG	
Control	124	29	59	36		29	95		88	36	
POAG	76	28	32	16		28	48	0.041	60	16	
NTG	131	35	66	30		35	96		101	30	

Table 27. Endothelin Receptor A +1222C>T (Female)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test  p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	124	74	42	8		74	50		116	8	
POAG	76	40	30	6		40	36		70	6	
NTG	131	66	54	11		66	65		120	11	
H-NTG	92	42	42	8		42	50	0.041	84	8	
L-NTG	35	21	11	3		21	14		32	3	

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 5 15mmHg or less.

#### Example 9. Correlation between Gene Polymorphism of Adrenalin receptor and Glaucoma

##### Methods

- 10 POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、アドレナリン受容体遺伝子の多型と緑内障との関連について、PCR-RFLP 法を用い調べた。

##### Results

$\beta 1$ -アドレナリン受容体の Arg389Gly 多型は、NTG と関連が認められた (Table 28)。

Table 28.  $\beta$ 1-Adrenalin Receptor Arg389Gly

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CG	GG		CC	CG+GG		CC+CG	GG	
Control	240	147	78	15		147	93		225	15	
POAG	191	127	58	6		127	64		185	6	
NTG	284	197	80	7	0.038	197	87		277	7	0.038

Example 10. Correlation between Gene Polymorphism of E-Selectin and glaucoma

#### 5 Methods

POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、E-selectin 遺伝子の多型と緑内障との関連について、インバーダー法を用い調べた。

#### Results

E-selectin の 1402C>T 多型は、POAG, NTG ともに関連が認められた (Table 10 29)。

Table 29. E-selectin 1402C&gt;T

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test  p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	224	138	67	19		138	86		205	19	
POAG	250	150	90	10		150	100		240	10	0.042
NTG	176	117	53	6		117	59		170	6	0.039

**Example 11. Correlation between Gene Polymorphism of Paraoxonase 1 and Glaucoma**

**Methods**

POAG 患者、NTG 患者および健常人を対象に、PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子の多型と緑内障との関連について、インバーダー法を用い調べた。

**Results**

PON1 遺伝子の Gly192Arg (Q192R) 多型は、POAG と関連が認められた (Table 30)。

PON1 遺伝子の Leu55Met (L55M) 多型は、NTG (特に最高眼圧が 15mmHg 以下) と関連が認められた (Table 31)。

**Table 30 PON1 Gly192Arg (Q192R)**

	N	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		$\chi^2$ test p
		QQ	QR	RR		QQ	QR+RR		QQ+QR	RR	
Control	224	32	107	85		32	192		139	85	
POAG	110	14	39	57	0.049	14	96	0.001	53	57	0.016
NTG	160	32	66	62		32	128		98	62	

**Table 31 PON1 Leu55Met (L55M)**

	N	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		$\chi^2$ test p
		LL	LM	MM		LL	LM+MM		LL+LM	MM	
Control	226	192	34	0		192	34		226	0	

POAG	110	97	13	0		97	13		110	0	
NTG	160	124	13	3	0.013	144	16		157	3	
H-NTG	122	111	10	1		111	11		121	1	
L-NTG	34	29	2	0.034		29	5		32	2	0.009

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg or less.

5

CLAIMS

1. 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも1つを解析する工程を含む、生体試料の遺伝子多型の検出方法。
  - (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン
  - (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン
  - (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損
  - (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
  - (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
  - (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
  - (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン
  - (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン
  - (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
  - (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
  - (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
  - (12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
  - (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
  - (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチ

ミンまたはグアニン

(15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

(16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシ

5 トシンまたはアデニン

(17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン

(18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン

10 (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン

(20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

(21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型

15 (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型

(23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン

(24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン

20 (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン

(26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン

25 (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン

- (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- 5 (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- (31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- (32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリ  
10 シンまたはアルギニン
- (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン
- 15 (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- (36) OPTN (オプチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- (37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたは  
20 チミン
- (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 412 位がアデニン
- (39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 603 位がアデニン
- 25 (40) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン



(41) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

2. 以下の工程 [I] から [III] を含む、視神経症の診断方法。

[I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1

5 つを解析する工程

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

10 (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損

(4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン

15 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

20 (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子：コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

(9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

(10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(11) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

25 (12) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン

- (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- 10 (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- 15 (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型
- (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190 位がグアニンまたはシトシン
- 20 (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン
- 25

- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306
- 5 位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- (31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- 10 (32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレ
- 15 オニンまたはイソロイシン
- (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- (36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- 20 (37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン
- (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 412 位がアデニン
- (39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 603 位がアデニン
- 25

- (40) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン
- (41) ミクロゾーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン
- [ I I ] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を
- 5 決定する工程、および
- [ I I I ] 決定された遺伝子型から視神経症の遺伝的リスクを求める工程。
3. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項 2 記載の方法。
4. さらに視神経症に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項 2 に記載の視神経症の診断方法。
- 10 5. 以下の工程 [ I ] から [ I I I ] を含む、緑内障の診断方法。
- ( I ) 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のうち、いずれか少なくとも 1 つを解析する工程
- (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン
- 15 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン
- (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損
- (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- 20 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
- (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- 25 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンま

たはグアニン

- (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- 5 (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチ
- 10 ミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- 15 (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン
- (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま
- 20 たはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型
- 25 (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190

- 位がグアニンまたはシトシン、
- (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677  
位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン  
5 またはアルギニン
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン
- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- 10 (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306  
位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A  
15
- (31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- (32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- 20 (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン
- (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイ  
25 シン

(36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

5 (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 412 位がアデニン

(39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 603 位がアデニン

[ I I ] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を  
10 決定する工程、および

[ I I I ] 決定された遺伝子型から緑内障の遺伝的リスクを求める工程。

6. 工程 [ I ] において、さらに緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項 5 に記載の緑内障の診断方法。

7. 請求項 5 の工程 [ I ] において、(1)、(2)、(5) ~ (7)、(16)、(1  
15 9) ~ (22)、(26) および (32) の遺伝子多型のいずれか少なくとも 1 つを解析することを特徴とする正常眼圧緑内障の診断方法。

(1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグア  
20 ニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

(6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

25 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンま

- たはグアニン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま
- 5 たはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型
- 10 (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン
- (32) BLAR ( $\beta 1$  アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
8. さらに正常眼圧緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、
- 15 請求項 7 に記載の診断方法。
9. 請求項 4 の工程 [I] において、(4)、(9) ~ (11)、(14)、(15)、(25)、(35)、(36) および (38) のいずれか少なくとも 1 つの遺伝子多型を解析することを特徴とする高眼圧緑内障の診断方法。
- (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンま
- 20 たはグアニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 713 位がチ
- 25 ミンまたはグアニン



- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシンまたはアルギニン
- 5 (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- (36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび
- 10 OPTN 遺伝子: 塩基番号 412 位がアデニン
10. さらに高眼圧緑内障に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項 9 に記載の診断方法。
11. 以下の工程 [I] から [III] を含む、レーベル病の診断方法。
- [I] 生体試料において、以下に示す遺伝子多型のいずれか少なくとも 1 つを解
- 15 析する工程
- (40) TP53 遺伝子: コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン
- (41) EPHX1 (ミクロソーム型エポキシドヒドラーゼ) 遺伝子: コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン
- [II] 前記工程によって得られる遺伝子多型情報から生体試料の遺伝子型を
- 20 決定する工程、および
- [III] 決定された遺伝子型からレーベル病の遺伝的リスクを求める工程。
12. 工程 [I] において、さらにレーベル病に公知の遺伝子多型を含めて解析することを含む、請求項 11 に記載のレーベル病の診断方法。
13. 遺伝子多型を、RFLP 法、PCR-SSCP 法、ASO ハイブリダ
- 25 イゼーション法、ダイレクトシーケンス法、ARMS 法、DGGE 法、RNA

s e A 切断法、化学切断法、D.P.L 法、TaqMan PCR 法、インベーター法、MALDI-TOF/MS 法、TDI 法、一塩基伸長法、WAVE 法、一分子蛍光検出法からなる群から選択される一つまたは二つ以上の方法による工程であることを特徴とする、請求項 1-12 に記載の方法。

- 5 14. 以下の (1) ~ (41) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む視神経症に関連した遺伝子の検出用キット。
- (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン
- 10 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン
- (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損
- (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- 15 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
- (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- 20 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン
- (8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子：コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- 25 (10) ミトコンドリア遺伝子：塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

- (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン
- (13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチ  
5 ミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシ  
トシンまたはチミン
- (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシ  
トシンまたはアデニン
- 10 (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニ  
ンまたはアデニン
- (18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシ  
ンまたはアデニン
- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンま  
15 たはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジ  
ンまたはセリン
- (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha$ 1A) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha$ 2) 遺伝子多型
- 20 (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190  
位がグアニンまたはシトシン
- (24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677  
位がシトシンまたはチミン
- (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン  
25 またはアルギニン

- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン
- (27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン
- 5 (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G
- (29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン
- (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A
- 10 (31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン
- (32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- 15 (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン
- (34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン
- (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン
- 20 (36) OPTN (オプチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン
- (37) SELE (E-セレクチン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン
- 25 (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子  $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび

- OPTN 遺伝子：塩基番号 412 位がアデニン
- (39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子：塩基番号-863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子：塩基番号 603 位がアデニン
- (40) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン
- 5 (41) ミクロソーム型エポキシドヒドラーゼ (EPHX1) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン
15. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項 14 記載のキット。
16. さらに視神経症関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 14 に記載のキット。
- 10 17. 以下の (1) ~ (39) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。
- (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン
- 15 (2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン
- (3) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子：塩基番号 138 位にアデニンが挿入または欠損
- (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- 20 (5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン
- (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：コドン番号 323 位がヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン
- 25 (7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子：塩基番号-231 位がアデニンま

たはグアニン

(8) EDNRB (エンドセリン受容体 B) 遺伝子: コドン番号 277 位のロイシンをコードする遺伝子中の塩基がグアニンまたはアデニン

(9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン

5 (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン

(11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン

(12) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9804 位がグアニンまたはアデニン

(13) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 11778 位がグアニンからアデニン

10 (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン

(15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン

(16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン

15 (17) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 1359 位がグアニンまたはアデニン

(18) CNR1 (カンナビノイド受容体 1) 遺伝子: 塩基番号 385 位がシトシンまたはアデニン

20 (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン

(20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン

(21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型

(22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型

25 (23) HSP70-1 (ヒートショックプロテイン 70-1) 遺伝子: 塩基番号 190

位がグアニンまたはシトシン

(24) MTHFR (メチレンテトラヒドロ葉酸還元酵素) 遺伝子: 塩基番号 677

位がシトシンまたはチミン

(25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン

5 またはアルギニン

(26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン

(27) PON2 (パラオキシナーゼ 2) 遺伝子: コドン番号 311 位がシステインまたはセリン

10 (28) MNP1 (マトリックスメタロプロテアーゼ 1) 遺伝子のプロモーター領域における 1G/2G

(29) MNP2 (マトリックスメタロプロテアーゼ 2) 遺伝子: 塩基番号-1306 位がシトシンまたはチミン

15 (30) MNP3 (マトリックスメタロプロテアーゼ 3) 遺伝子のプロモーター領域における 5A/6A

(31) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 49 位がセリンまたはグリシン

(32) B1AR ( $\beta$ 1 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン

20 (33) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 16 位がアルギニンまたはグリシン

(34) B2AR ( $\beta$ 2 アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 164 位がスレオニンまたはイソロイシン

25 (35) ミオシリン遺伝子: コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

(36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子: 塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(37) SELE (E-セレクトイン) 遺伝子: 塩基番号 1402 位がシトシンまたはチミン

5 (38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-857 位がチミンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 412 位がアデニン

(39) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子: 塩基番号-863 位がアデニンおよび OPTN 遺伝子: 塩基番号 603 位がアデニン

10 18. さらに緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 17 に記載のキット。

19. 以下の (1)、(2)、(5) ~ (7)、(16)、(19) ~ (22)、(26) および (32) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む正常眼圧緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。

15 (1) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: コドン番号 198 位がリジンまたはアスパラギン

(2) EDN1 (エンドセリン 1) 遺伝子: 塩基番号-1370 位がチミンまたはグアニン

(5) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 1222 位がシトシンまたはチミン

20 (6) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: コドン番号 323 位のヒスチジンをコードする遺伝子中の塩基がシトシンまたはチミン

(7) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号-231 位がアデニンまたはグアニン

25 (16) AT2 (アンギオテンシン II 受容体 2) 遺伝子: 塩基番号 3123 位がシトシンまたはアデニン



- (19) 5-HT2A (セロトニン受容体 2A) 遺伝子: 塩基番号 102 位がチミンまたはシトシン
- (20) 5-HT2C (セロトニン受容体 2C) 遺伝子: コドン番号 23 位がシチジンまたはセリン
- 5 (21) CACNA1A (カルシウムチャンネル  $\alpha 1A$ ) 遺伝子多型
- (22) ATP1A2 (ナトリウム/カリウムポンプ 1 $\alpha 2$ ) 遺伝子多型
- (26) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 55 位がロイシンまたはメチオニン
- (32) B1AR ( $\beta 1$  アドレナリン受容体) 遺伝子: コドン番号 389 位がグリシンまたはアルギニン
- 10 20. さらに正常眼圧緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 19 に記載のキット。
21. 以下の (4)、(9) ~ (11)、(14)、(15)、(25)、(35)、(36) および (38) からなるグループより選択される一つ以上の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む高眼圧緑内障に関連した遺伝子の検出用キット。
- 15 (4) EDNRA (エンドセリン受容体 A) 遺伝子: 塩基番号 70 位がシトシンまたはグアニン
- (9) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9099 位がシトシンまたはアデニン
- (10) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはグアニン
- 20 (11) ミトコンドリア遺伝子: 塩基番号 9101 位がチミンまたはシトシン
- (14) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-713 位がチミンまたはグアニン
- (15) AT1 (アンギオテンシン II 受容体 1) 遺伝子: 塩基番号-521 位がシトシンまたはチミン
- 25 (25) PON1 (パラオキシナーゼ 1) 遺伝子: コドン番号 192 位がグリシン

またはアルギニン

(35) ミオシリン遺伝子：コドン番号 369 位がフェニルアラニンまたはロイシン

(36) OPTN (オブチニューリン) 遺伝子：塩基番号 412 位がグアニンまたはアデニン

(38) TNF- $\alpha$  (腫瘍壊死因子 $\alpha$ ) 遺伝子：塩基番号 857 位がチミンおよび OPTN 遺伝子：塩基番号 412 位がアデニン

22. さらに高眼圧緑内障に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 21 に記載のキット。

10 23. 以下の (40) ~ (41) の遺伝子のプライマーまたはプローブを含むレーベル病に関連した遺伝子の検出用キット。

(40) TP53 遺伝子：コドン番号 72 位がアルギニンまたはプロリン

(41) EPHX1 (ミクロソーム型エポキシドヒドラーゼ) 遺伝子：コドン番号 113 位がチロシンまたはヒスチジン

15 24. さらにレーベル病に関連した公知の遺伝子のプライマーまたはプローブを含む請求項 23 に記載のキット。

25. 塩基番号 9099 位がシトシンからアデニンに変異したミトコンドリア遺伝子。

20 26. 塩基番号 9101 位がチミンからグアニンに変異したミトコンドリア遺伝子。

27. コドン番号 369 位がフェニルアラニンからロイシンに変異したアミノ酸をコードするミオシリン遺伝子。

28. ミオシリン遺伝子に変異を有する対象において、正常および変異のミオシリンをブロックすることを特徴とする緑内障の処置方法。

25 29. RNAi 法によって、正常および変異のミオシリンをブロックすることを

特徴とする請求項 28 に記載の緑内障の処置方法。

30. 視神経症に関連した遺伝子多型を解析し、解析によって得られた遺伝子型と薬剤に対する反応性、治療効果を結びつけることを特徴とする薬剤感受性の予測方法。

5 31. 視神経症が緑内障あるいはレーベル病である請求項 30 に記載の方法。

32. 視神経症が緑内障である請求項 30 に記載の方法。

33. アンギオテンシン II 受容体 2 遺伝子の塩基番号 2123 位がシトシンまたはアデニンである遺伝子多型ことを解析することを特徴とする請求項 30 に記載の方法。

10 34. 薬剤がアンギオテンシン II 受容体拮抗薬である請求項 30 に記載の方法。

ABSTRACT

本発明は、視神経症、特に緑内障およびレーベル病を発症する危険因子を検出可能な危険遺伝子を用いて、視神経症の発症のリスクを判定するための、新規な診断方法および診断のためのキットを提供する。

FIG. 1

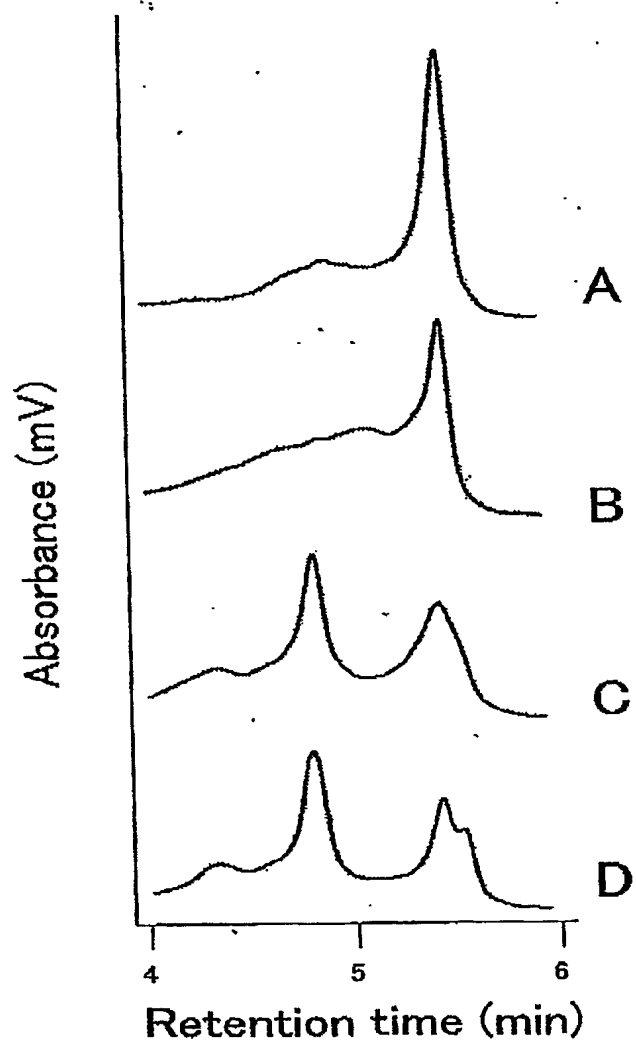


Fig. 2

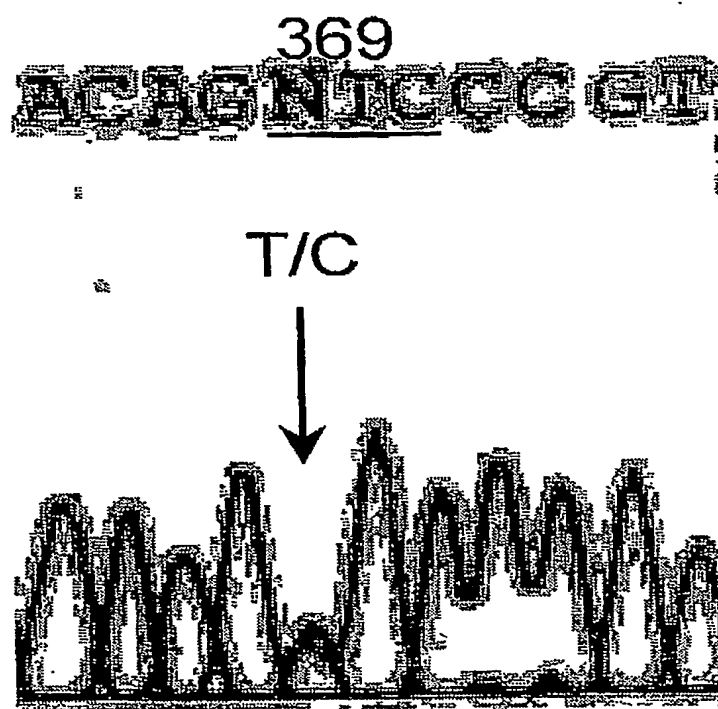


Fig. 3

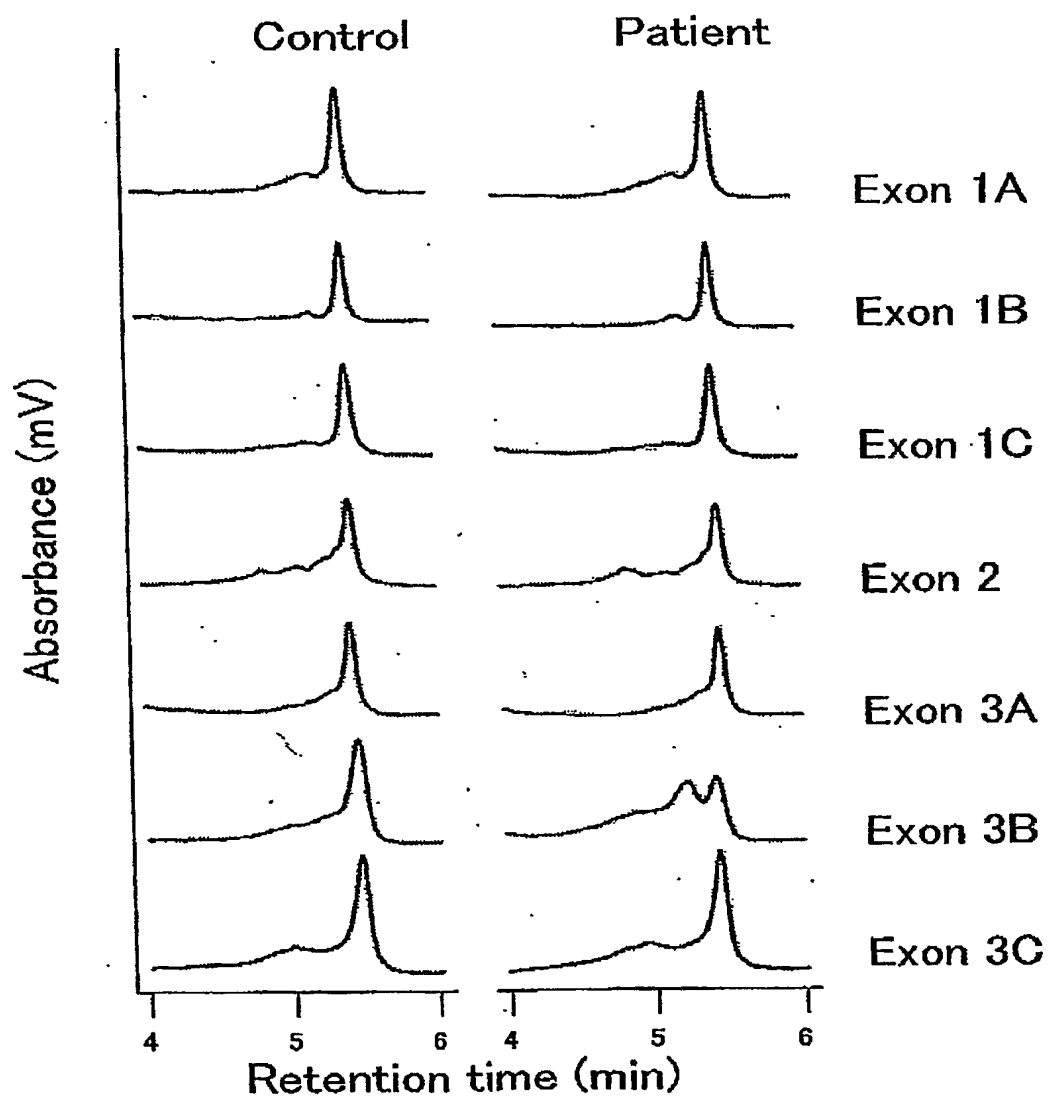


Table 1. Primer sequences, product size, and annealing temperatures

Gene	Primer sequences		Product Size (bp)	Annealing Temperature (°C)	Restriction Enzyme
TP53	F	TTG CCG TCC CAA GCA ATG GAT GA	199	60.0	Acc II
	R	TCT GGG AAG GGA CAG AAG ATG AC			
EPHX1	F	GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C	165	56.0	EcoR V
	R	TCA ATC TTA GTC TTG AAG TGA GGA T			



Table 2-1. Association between age at onset and TP53 (Arg72Pro) and EPHX1 (Tyr113His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

Gene	Genotype		P
	Arg/Arg	Arg/Pro + Pro/Pro	
TP53 (Arg72Pro) Age at onset	20.7±10.6 (n=35)	28.1±13.8 (n=51)	0.009
EPHX1 (Tyr113His) Age at onset	Tyr/Tyr + Tyr/His 27.9±13.9 (n=45)	His/His 22.1±11.4 (n=41)	0.038

P Value for t-test

Table 2-2. Association between age at onset and TP53 (Arg/Arg) and EPHX1 (His/His) gene polymorphism in Leber's hereditary optic neuropathy

(His/His) gene polymorphism			
Group 1	Group 2	Group 3	P
	Arg/Arg or His/His	others	
Arg/Arg and His/His 17.7±9.3 (n=19)	25.3±11.3 (n=38)	29.8±15.1 (n=29)	0.0044

P value for Kruskal-Wallis

- Group 1: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 and His/His at codon 113 in EPHX1  
 Group 2: Patients who have Arg/Arg at codon 72 in TP53 but not His/His at codon 113 in EPHX1,  
           or His/His at codon 113 in EPHX1 but not Arg/Arg at codon 72 in TP53  
 Group 3: Patients other than Groups 1 and 2

Table 3 The oligonucleotide sequence of wild type, mutant, and Invader probes with Invader assay to detect mutations of mtDNA

Nucleotide	Target	Probe	Sequence	Tm	Dye
G3460A	Anti-sense	Wild	ACGACCGCGAGGgcataaaaactcttcacca	63.2	RED
		Mutant	CGCGCCGAGGaccataaaaactcttcacacaa	63.3	FAM
		Invader	cctacggggtactacaacccctcgctgact	77.7	
T9101C	sense	Wild	CGCGCCGAGGatgataagtgtagagggaagg	64.1	FAM
		Mutant	ACGACCGCGAGgtgataagtgtagagggaag	62.2	RED
		Invader	ggcgacagcgatttctaggatagtcagtagaattgaattgtgaagT	76.8	
G9804A	anti-sense	Wild	ACGACCGCGAGGgcacacaggcttcca	63.7	FAM
		Mutant	CGCGCCGAGGaccacaggcttccac	63.7	RED
		Invader	cattccgacggcatctacgggtcaacattttttgtat	76.7	
G11778A	Anti-sense	Wild	ACGACCGCGAGGgcataataatcctctcctcaag	63.5	RED
		Mutant	CGCGCCGAGGacataataatcctctcctcaag	62.2	FAM
		Invader	gcctagcaaaactcaaaactacgaacgcactcacagtct	77.7	
T14484C	Sense	Wild	CGCGCCGAGGatggtgtctcttggatatactac	63.4	FAM
		Mutant	ACGACCGCGAGgtgtgtgtctcttggatatacta	62.8	RED
		Invader	ttttggggagggttatatgggttaaatagttttttaattatttagggggaatgt	76.0	
T14498C	sense	Wild	CGCGCCGAGGatttagggggaatgatgggt	64.0	FAM
		Mutant	ACGACCGCGAGgttttagggggaatgatgg	62.7	RED
		Invader	tgttattattctgaatttggggagggttatatgggttaaatagttttttaattttT	74.1	

Table 4. Primer sequences

mutation		Primer Sequences (5' to 3')	
3460	F	CAG TCA GAG GTT CAA TTC CTC	
	R	TGG GGA GGG GGG TTC ATA GTA	
11778	F	GGC GCA GTC ATT CTC ATA AT	
	R	AAG TAG GAG AGT GAT ATT TG	
14484	F	無し	
	R	GCT TTG TTT CTG TTG AGT GT	
9101	F	AAA ATG CCC TAG CCC ACT TC	
	R	GTC ATT ATG TGT TGT CGT GC	
9804	F	CAC ATC CGT ATT ACT CGC AT	
	R	CGG ATG AAG CAG ATA GTG AG	

Table 5.

Case	mtDNA mutation	Patient
1	C9099A mutation (Ile to Met)	POAG (Male)
2	T9101G mutation (Ile to Ser)	POAG (Female)
3	T9101C mutation (Ile to Thr)	POAG (Female)
4	G9804A mutation (Ala to Thr)	POAG (Male)
5	G9804A mutation (Ala to Thr)	NTG (Female)
6	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 80%	POAG (Female)
7	G11778A mutation (Arg to His) heteroplasmy 15%	NTG (Male)

Table 6. Primer pair sequences used for PCR amplification and restriction enzymes of polymorphic sites in renin angiotensin system

Gene	Polymorphism	Primer sequences	Annealing temp	Product size	Restriction enzyme	Digested products
REN	I8-83G>A	TGAGGTCGAGTCGGCCCCCT TCGCCAAACATGGCCACACAT	68°C	250bp	MboI	G: 250bp A: 171+79bp
ACE	I/D 1st step	GCCCTGCAGGTGCTGCAGCATGT GGATGGCTCTCCCGCCTGTCTC	63°C	D: 319bp I: 597bp		
	2nd step	TGGCAGCAGAGCGCCGCCACTAC TCGCCAGCCCTCCGATGCCATAA	67°C	D/D: no product I: 335bp		
AT1	1166A>C	GAGGTGAGTGACATGTCGAAC CGTCATCTCTTAATGCATAATGT	60°C	253bp	DdeI	A: 253bp C: 155+98bp
	-521C>T	CGTGATGCTTTATCTGGTTTG CGAACTTTGGTAATACAGTTGG	60°C	270bp	SspI	C: 270bp T: 144+126bp
	-713T>G	AAACTACAGTCACCTACTCACCT TTCTTCACAAACTCTTCCAA	55°C	292bp	HinfI	T: 170+122bp G: 292bp
AT2	3123C>A	GGATTCAGATTCTCTTTGAA GCATAGGAGTATGATTTAATC	53°C	340bp	AluI	C: 340bp A: 227+113bp
CYP11B1	-344C>T	CAGGAGGATGAGCAGGACAGACAG CTCACCCAGGAACCTGCTCTGGAACATA	63°C	404 bp	HaeIII	C: 333bp + 71bp T: 404 bp
CMA	-1903A>G	GGAAATGTGAGCAGATAGTGCAGTC AATCCGGAGCTGGAGAACTCTTGC	51°C	285bp	BstXI	A: 285bp G: 195+90bp

Table 7. Association between glaucoma (POAG and NTG) and gene polymorphism of the renin-angiotensin aldosterone system.

Gene	Gene Polymorphism		Genotype Frequency		P
			GG+GA	AA	
Renin	I8-83G>A	POAG (n=153)	152 (99.3%)	1 (0.7%)	0.031
		NTG (n=185)	177 (95.7%)	8 (4.3%)	
		Control (n=183)	173 (94.5%)	10 (5.5%)	
			TT+TG	GG	P
AT1	-713T>G	POAG (n=165)	158 (95.8%)	7 (4.2%)	0.04
		NTG (n=208)	208 (100%)	0 (0.0%)	
		Control (n=198)	197 (99.5%)	1 (0.5%)	
			CC	CA+AA	P
AT2	3123C>A (Female)	POAG (n=79)	34 (43.0%)	45 (56.0%)	0.011
		NTG (n=120)	35 (29.2%)	85 (70.8%)	
		Control (n=111)	54 (45.0%)	66 (55.0%)	

Table 8. Distribution of genotypes of AT1 -521T allele and -713G allele

Group	A	B	P
POAG (n=165)	7 (4.2%)	158 (95.8%)	0.011
NTG (n=208)	0 (0.0%)	208 (100.0%)	
Control (N=198)	0 (0.0%)	198 (100.0%)	

A: Subjects with two -521 alleles and two -713G alleles

B: Subjects not satisfying the criteria for Group A.

Table 9.

Mutation	nucleotide change	Target	Probe	Sequence	T <sub>m</sub>	Dye
EDN Ex5 GT	G to T	Sense	Wild	cgcgccgagcTTGGCTTTCAGCTTGG	64.6	FAM
			Mutant	acggacgcggagATTGCCCTTTCAGCTTGG	64.0	RED
			Invader	GTTGTGGTCACATAACGCCTCTCTGGAGGGT	76.9	

Table 10. The genotype frequency at codon 198 in exon 5 of ET gene

Group	n	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p
		Lys/lys	Lys/Asn	Asn/Asn		Lys/lys	Lys/Asn + Asn/Asn	
Control	213	94 (44.1%)	93 (43.7%)	26 (12.2%)		94 (44.1%)	119 (55.9%)	
NTG	214	120 (56.1%)	72 (33.6%)	22 (10.3%)	0.046	120 (56.1%)	94 (43.9%)	0.014
POAG	178	82 (46.1%)	77 (43.3%)	19 (10.7%)		82 (46.1%)	96 (53.9%)	

Table 11. Primer sequences, product size, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon	Primer sequences (5' to 3')		Product size (bp)	PCR T <sub>m</sub> (°C)	DHPLC T <sub>m</sub> (°C)
1A	F	AGC ACA GCA GAG CTT TOC AGA GGA	302	58.0	61.9
	R	CTC CAG GTC TAA GCG TTG G			
1B	F	CAG GCC ATG TCA GTC ATC CA	298	58.0	61.2, 64.5
	R	TCT CAT TTT CTT GGC TTA GTC			
1C	F	GAA ACC CAA ACC AGA GAG	255	58.0	61.0, 63.5
	R	ATA TCA COT GCT GAA CTC AGA GTC			
2A	F	CCT CAA CAT AGT CAA TCG TTG GGC	245	58.0	56.3, 59.3
	R	ACA TGA ATA AAG ACC ATG TGG GCA			
3A	F	GAT TAT GGA TTA AGT GGT GGT TCG	375	58.0	59.3, 61.3, 62.3
	R	TGT CTC GGT ATT CAG CTC AT			
3B	F	CAT ACT GGC TAG GGC ACT GGA	337	58.0	60.9, 61.4
	R	ATT GGC GAC TGA CTG CTT AC			
3C	F	GAA TCT GGA ACT CGA ACA AA	333	58.0	59.7, 61.7
	R	CTG AGC ATC TCC TTC TGC CAT			

Table 12. MYOC mutations and polymorphisms in patients with POAG and controls

	Exon	Sequence		Amino acid change	Frequency	
		change		change	patients	controls
Mutations	3	c.1079T>A	Ile360Asn		1/171	0/100
	3	c.1087G>A	Ala363Thr		2/171	0/100
	3	c.1105T>C	Phe369Leu <sup>*</sup>		1/171	0/100
	3	c.1342A>C	Thr448Pro		1/171	0/100
Polymorphisms	1	c.34G>C	Gly12Arg		1/171	2/100
	1	c.57G>T	Gln19His		1/171	1/100
	1	c.136C>T	Arg46Stop		1/171	1/100
	1	c.210C>T	Val70Val <sup>†</sup>		2/171	0/100
	1	c.227G>A	Arg76Lys		14/171	9/100
	1	c.369C>T	Thr123Thr		1/171	0/100
	1	c.473G>A	Arg158Gln		1/171	1/100
	2	c.611C>T	Thr204Met		0/171	1/100
	2	c.624C>G	Asp208Glu		5/171	2/100
	3	c.864C>T	Ile288Ile		1/171	0/100
	3	c.1110G>A	Pro370Pro		0/171	1/100
	3	c.1441C>T	Pro481Ser		1/171	0/100
	3	c.1464C>T	Ala488Ala		3/171	1/100

<sup>\*</sup> Novel myocilin mutation; <sup>†</sup> novel myocilin polymorphism.



Table 13. Primer sequences, PCR product sizes, and PCR annealing and DHPLC analysis temperatures

Exon	Primer Sequences (5' to 3')	PCR product size (bp)	PCR T <sub>m</sub> (°C)	DHPLC T <sub>m</sub> (°C)
4	F CCAGTGGGTTTGGGACTCC R AAAGGGATGGCAATTCITGCA	317	60	61.7
5	F GTCCACTTCTCTGGTGTGACT R CAACATCACAATGGATCG	277	55	58.7
6	F AGCCTTAGTTTGATCTGTCAITCA R GTTTCATCTTCCAGGGGAGGCT	293	60	57.0, 62.5
7	F GC-clamp AATCCCTTGCAATTTCTGTTTT R GTGACAAGCACCCAGTGACGA	188	55	59.4, 61.4, 62.4
8	F GC-clamp GGTTACTCTCTCTTAGTCTTTGGA R GGGTGAACGTGATGGTATCTTAATT	320	57	54.6, 58.5
9	F GC-clamp GCTATTTCTCTTAAAGCCAAAGAGA R CAGTGGCTGGACTACTCTCGT	242	55	57.4, 59.4
10	F GC-clamp GTCAGATGATAATGTACAGATAT R AATGTATATTTCAAAGGAGGATAAA	227	55	57.8, 59.8
11	F CCACTGGACGTAAAGGAGCA R CAAATCCGAAATTCCAATCTGTATAA	286	60	57.5, 59.5
12	F GC-clamp GGTGGGAGGCAAGACTATAAGTT R TTCTGTTCATTACTAGGCTATGGAA	233	60	55.5, 56.5
13	F CAGGCAGAAATTATTCAAAACCAT R CGAGAATACAGTCAGGGCTGG	264	60	58.9, 61.9
14	F GCACTACCTCTCATCGCATAAACA R GGCCATGCTGATGTGAGCTCT	260	60	56.7, 59.7
15	F GC-clamp GGACTGTCTCTCTCAGTGTGTCA R GGTGCCITGATTGGAAATCCA	282	60	56.0, 59.0, 61.0
16	F GC-clamp CACAACCTGCCTGCAAAATGGAAC R GAGGCAAAATATTGAGTGAAAACA	294	60	61.7

GC-clamp : CGCCCGCCGCCGCCGCCG

Table 14. OPTN variants observed in glaucoma patients and control subjects

Location	Sequence Changes	Codon Changes	Frequency in Subjects (%)			
			POAG	NTG	Control	
Exon 4	c.386C>G	His26Asp	1/201 (0.5)	0/232 (0)	0/218 (0)	
Exon 4	c.449-451delCTC	Leu47del	0/201 (0)	0/232 (0)	1/218 (0.5)	
Exon 5	c.603T>A	Met98Lys	33/201 (16.4)	50/232 (21.6)	36/218 (16.5)	
Exon 16	c.1944G>A	Arg545Gln	14/192 (7.3)	15/222 (6.8)	11/214 (5.1)	
Exon 4	c.412G>A	Thr34Thr	69/201 (34.3)	74/232 (31.9)	52/218 (23.9)	
Exon 4	c.421G>A	Pro37Pro	0/201 (0)	1/232 (0.4)	0/218 (0)	
Exon 4	c.457C>T	Thr49Thr	2/201 (1)	0/232 (0)	0/218 (0)	
Exon 16	c.2023C>T	His571His	0/162 (0)	0/193 (0)	2/196 (1.0)	
Intron 4	c.476+15C>A		0/201 (0)	0/232 (0)	1/218 (0.5)	
Intron 6	c.863-10G>A*		N/C†	N/C	N/C	
Intron 6	c.863-5C>T*		N/C	N/C	N/C	
Intron 8	c.1089+20G>A		4/133 (3.0)	11/172 (6.4)	4/126 (3.2)	
Intron 9	c.1192+19C>T		0/133 (0)	4/172 (2.3)	3/130 (2.3)	
Intron 11	c.1458+28G>C		1/133 (0.8)	4/172 (2.3)	0/157 (0)	
Intron 15	c.1922+10G>A		2/133 (1.5)	4/172 (2.3)	1/157 (0.6)	
Intron 15	c.1922+12G>C		0/133 (0)	1/172 (0.6)	0/157 (0)	
Intron 15	c.1923-48C>A*		N/C	N/C	N/C	

\* Sequence variation was found by direct sequencing analysis.

† Not checked

Table 15. Genotype distribution and allele frequency of optineurin gene polymorphisms in glaucoma patients and controls

c.412G>A (Thr34Thr)															
Phenotype	n	Genotype frequency (%)			P value*	Genotype frequency (%)			P value†	Genotype frequency (%)			Allele frequency (%)		P value*
		G/G	G/A	A/A		G/G	G/A	A/A		G/G+G/A	A/A	P value†	G	A	
POAG	194	125 (64.4)	61 (31.4)	8 (4.1)	0.011 ±	125 (64.4)	69 (35.6)	0.009 §	0.009 §	186 (95.9)	8 (4.1)	0.051	311 (80.2)	77 (19.8)	0.003 §
NTG	217	148 (68.2)	62 (28.6)	7 (3.2)	0.078	148 (68.2)	69 (31.8)	0.084	0.084	210 (96.8)	7 (3.2)	0.105	358 (82.5)	76 (17.5)	0.034 ±
Control	218	166 (76.1)	50 (22.9)	2 (1.0)		166 (76.1)	52 (23.9)			216 (99.0)	2 (1.0)		382 (87.6)	54 (12.4)	

c.603T>A (Met98Lys)															
Phenotype	n	Genotype frequency (%)			P value*	Genotype frequency (%)			P value†	Genotype frequency (%)			Allele frequency (%)		P value*
		T/T	T/A	A/A		T/T	T/A	A/A		T/T+T/A	A/A	T	A		
POAG	194	161 (83.0)	32 (16.5)	1 (0.5)	0.990	161 (83.0)	33 (17.0)	0.893	0.893	193 (99.5)	1 (0.5)	1	354 (91.2)	34 (8.8)	0.888
NTG	217	169 (77.8)	43 (19.8)	5 (2.3)	0.133	169 (77.8)	48 (22.1)	0.139	0.139	212 (97.7)	5 (2.3)	0.122	381 (87.8)	53 (12.2)	0.071
Control	218	182 (83.5)	35 (16.0)	1 (0.5)		182 (83.5)	36 (16.5)			217 (99.5)	1 (0.5)		399 (91.5)	37 (8.5)	

\* P value for  $\chi^2$  test.

† P value for Fisher's exact test.

‡  $P < 0.05$

§  $P < 0.01$

Table 16 Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to *OPTN* genotypes

c.412G>A (Thr34Thr)		G/G	G/A+A/A	P value*
POAG	Age at diagnosis (ys)	58.1 ± 11.8 (n = 123)	58.8 ± 12.6 (n = 69)	0.663
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.0 ± 6.5 (n = 112)	26.1 ± 5.0 (n = 60)	0.360
	Visual field score at diagnosis	3.0 ± 0.9 (n = 125)	3.2 ± 0.9 (n = 69)	0.093
NTG	Age at diagnosis (ys)	58.7 ± 11.7 (n = 148)	56.6 ± 11.2 (n = 69)	0.206
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.4 ± 2.6 (n = 139)	16.6 ± 2.2 (n = 67)	0.848
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 148)	2.7 ± 0.7 (n = 69)	0.135

c.603T>A (Met98Lys)		T/T	T/A+A/A	P value*
POAG	Age at diagnosis (ys)	57.6 ± 11.9 (n = 159)	62.2 ± 12.4 (n = 33)	0.046†
	IOP at diagnosis (mm Hg)	26.8 ± 5.8 (n = 143)	26.5 ± 7.1 (n = 29)	0.931
	Visual field score at diagnosis	3.1 ± 0.9 (n = 161)	3.2 ± 0.9 (n = 33)	0.280
NTG	Age at diagnosis (ys)	58.4 ± 11.6 (n = 169)	56.6 ± 11.6 (n = 48)	0.304
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.4 ± 2.4 (n = 160)	16.8 ± 2.6 (n = 46)	0.270
	Visual field score at diagnosis	2.8 ± 0.7 (n = 169)	2.8 ± 0.6 (n = 48)	0.318

\* P values for Mann-Whitney U test.

† P < 0.05

Table 17 Distribution of optineurin genotypes (c.412G>A and c.803T>A) according to TNF- $\alpha$  genotypes (-857C>T and -883C>A)

c.412G>A (Thr34Thr)		C/C (%)		C/T+T/T (%)		Odds ratio	
Phenotype	-857C>T	G/G	G/A + A/A	P value*	G/G	G/A + A/A	95 % CI
POAG	c.412G>A	92 (88.1)	43 (31.9)	0.204	33 (55.9)	26 (44.1)	1.40 (0.83-2.37)
NTG		97 (85.5)	51 (34.5)	0.077	51 (73.8)	18 (26.1)	1.58 (0.95-2.62)
Control		108 (75.0)	38 (25.0)		58 (78.4)	16 (21.6)	
c.603T>A (Met98Lys)		C/C (%)		C/T+T/T (%)		Odds ratio	
Phenotype	-857C>T	G/G	G/A + A/A	P value*	G/G	G/A + A/A	95 % CI
POAG	c.603T>A	91 (84.6)	50 (35.5)	0.017	34 (64.2)	19 (35.8)	1.84 (1.11-3.05)
NTG		110 (69.2)	48 (30.8)	0.114	38 (65.5)	20 (34.5)	1.49 (0.91-2.46)
Control		124 (77.0)	37 (23.0)		42 (73.7)	15 (26.3)	
c.803T>A (Met98Lys)		C/C (%)		C/T+T/T (%)		Odds ratio	
Phenotype	-857C>T	G/G	G/A + A/A	P value*	G/G	G/A + A/A	95 % CI
POAG	c.803T>A	112 (83.0)	23 (17.0)	0.811	48 (83.1)	10 (16.9)	1.08 (0.57-2.03)
NTG		111 (75.0)	37 (25.0)	0.056	58 (84.1)	11 (15.9)	1.75 (0.98-3.13)
Control		121 (84.0)	23 (16.0)		61 (82.4)	13 (17.6)	
c.803T>A (Met98Lys)		C/C (%)		C/T+T/T (%)		Odds ratio	
Phenotype	-883C>A	G/G	G/A + A/A	P value*	G/G	G/A + A/A	95 % CI
POAG	c.803T>A	123 (87.2)	18 (12.8)	0.127	38 (71.7)	15 (28.3)	0.81 (0.33-1.15)
NTG		126 (78.6)	34 (21.4)	0.636	44 (75.9)	14 (24.1)	1.14 (0.66-1.97)
Control		130 (80.7)	31 (19.3)		52 (91.2)	5 (8.8)	

\* P values for X<sup>2</sup> test.

† P < 0.05

# P < 0.01

Table 18 Comparison of clinical characteristics of glaucoma patients according to TNF- $\alpha$  genotypes (-857T and -863A) and optineurin genotypes (412A and 603A)

c.412G>A (Thr34Thr)		(TNF- $\alpha$ genotypes)		C/T+T/T (-857T carrier)		P value*
		(OPTN genotypes)		G/G	G/A+A/A	
POAG	Age at diagnosis (ys)	57.1 $\pm$ 10.7 (n = 32)		57.6 $\pm$ 13.1 (n = 26)		0.802
	IOP at diagnosis (mm Hg)	26.4 $\pm$ 6.1 (n = 30)		26.4 $\pm$ 5.5 (n = 20)		0.786
	Visual field score	2.9 $\pm$ 0.9 (n = 33)		3.3 $\pm$ 0.8 (n = 26)		0.020†
NTG	Age at diagnosis (ys)	58.4 $\pm$ 11.1 (n = 51)		59.3 $\pm$ 10.5 (n = 18)		0.790
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.4 $\pm$ 2.6 (n = 46)		16.1 $\pm$ 2.3 (n = 17)		0.520
	Visual field score	2.8 $\pm$ 0.8 (n = 51)		2.6 $\pm$ 0.5 (n = 18)		0.335
c.603T>A (Met98Lys)		(TNF- $\alpha$ genotypes)		C/A+A/A (-863A carrier)		P value*
		(OPTN genotypes)		T/T	T/A+A/A	
POAG	Age at diagnosis (ys)	56.3 $\pm$ 10.5 (n = 38)		62.0 $\pm$ 13.8 (n = 15)		0.074
	IOP at diagnosis (mm Hg)	27.9 $\pm$ 6.5 (n = 36)		26.9 $\pm$ 8.7 (n = 14)		0.488
	Visual field score	3.0 $\pm$ 0.8 (n = 38)		3.5 $\pm$ 0.9 (n = 15)		0.026†
NTG	Age at diagnosis (ys)	57.9 $\pm$ 11.4 (n = 44)		56.9 $\pm$ 11.9 (n = 14)		0.579
	IOP at diagnosis (mm Hg)	16.2 $\pm$ 2.4 (n = 40)		16.9 $\pm$ 2.4 (n = 14)		0.364
	Visual field score	2.9 $\pm$ 0.5 (n = 44)		2.7 $\pm$ 0.6 (n = 14)		0.296

\* P values for Mann-Whitney U test.

† P < 0.05

Table 19.

Table 19.											
内服前 Base Line	眼圧下降量mmHg							遺伝子多型AT2/3123C>A			
	1時間後	2時間後	3時間後	4時間後	5時間後	6時間後	24時間後	男性	男性	女性	女性
0	-2	-1	-3	-2	-1	-1	-1	-1	A		
0	-2	-2	0	0	-1	1	1	1	A		
0	1	1	0	0	-2	-2	0	0	A		
0	0	0	-2	1	0	0	-1	-1	C		
0	-1	-3	-5	-2	-3	-3	-3	-3	C		
0	0	-3	-2	-4	-3	0	0	0			CA
0	-1	-1	-4	-3	-4	-3	1	1	C		
0	-2	-4	-4	-4	-4	-5	-2	-2	C		
0	-2	-3	-3	-2	-2	1	2	2			CC
0	-2	-3	-2	-5	-3	-3	0	0	C		
0	-4	-6	-6	-6	-6	-4	-5	-5			CA
0	-4	-5	-6	-5	-5	-5	-7	-7	C		CA
0	-4	-6	-6	-8	-5	-5	-4	-4			CA
0	-2	-3	-6	-5	-6	-3	-3	-3	C		
0	-2	-4	-4	-6	-3	-4	-5	-5			CC
0	-4	-8	-6	-7	-6	-6	-2	-2			CC
0	-4	-4	-5	-3	-5	-4	0	0			CC
0	-1	-4	-6	-3	-6	-4	-3	-3			
0	-2	-4	-7	-5	-7	-6	-1	-1	C		
0	-2	-7	-6	-4	-6	-6	-12	-12		A	
0	-6	-8	-8	-12	-12	-12	-12	-12			

I: 眼圧下降無効例

II: 眼圧下降効果+例

III: 眼圧下降効果++例

4例中3例はA

6例中5例はCまたはCC

11例中7例はCまたはCC

すなわちAを持つと眼圧が下がり難く、Cを持つと下がりやすい

多型はX染色体

男性はCまたはAを持つ

女性にはCC、CAまたはAAを持つ

Table 20. Endothelin A138I/D (Male)

TABLE 20: ERGASTOLIN											
	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test P
		Frequency				Frequency			Frequency		
		I/I	I/D	D/D		I/I	I/D+D/D		I/I+I/D	D/D	
Control	100	4	34	62		4	96		38	62	
POAG	100	3	21	76		3	97		24	76	0.032
NTG	119	1	28	90		1	118		29	90	0.025

Table 21. Endothelin Receptor A -231A&gt;G (Male)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test  p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		AA	AG	GG		AA	AG+GG		AA+AG	GG	
Control	100	22	45	33		22	78		67	33	
POAG	100	24	51	25		24	76		75	25	
NTG	119	30	60	29		30	89		90	29	
H-NTG	89	17	45	27		17	72		62	27	
L-NTG	25	11	12	2	0.017	11	14	0.026	23	2	0.025

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16  
5 mmHg-21mmHg.

L-NTG: NTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg  
or less.



Table 22. Endothelin Receptor A H323H C>T His323His (Male)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	100	9	40	51		9	91		49	51	
POAG	100	7	38	55		7	93		45	55	
NTG	119	11	50	58		11	108		61	58	
H-NTG	89	7	32	50		7	82		39	50	
L-NTG	25	4	14	7		4	21		18	7	0.039

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg  
5 or less.

Table 23. Endothelin Receptor B L277L G>A Leu277Leu (Male)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test  p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		GG	GA	AA		GG	GA+AA		GG+GA	AA	
Control	100	18	41	41		18	82		59	41	
POAG	100	26	48	26		26	74		74	26	0.005
NTG	119	26	61	32		26	93		87	32	0.002

Table 24. Endothelin Lys198Asn G>T or K198N (Female)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		KK	KN	NN		KK	KN+NN		KK+KN	NN	
Control	124	52	59	13		52	72		111	13	
POAG	76	38	33	5		38	38		71	5	
NTG	131	78	38	15	0.009	78	53	0.010	114	17	

Table 25. Endothelin -1370T>G (Female)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test
		Frequency				Frequency			Frequency		
		TT	TG	GG		TT	TG+GG		TT+TG	GG	
Control	124	66	56	2		66	58		122	2	
POAG	76	49	24	3		49	27		73	3	
NTG	131	84	39	8	0.018	84	47		123	8	

5 Table 26. Endothelin Receptor A +70C>G (Female)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CG	GG		CC	CG+GG		CC+CG	GG	
Control	124	29	59	36		29	95		88	36	
POAG	76	28	32	16		28	48	0.04	60	16	
NTG	131	35	66	30		35	96		101	30	

Table 27. Endothelin Receptor A +1222C>T (Female)

	n	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	124	74	42	8		74	50		116	8	
POAG	76	40	30	6		40	36		70	6	
NTG	131	66	54	11		66	65		120	11	
H-NTG	92	42	42	8		42	50	0.020	84	8	
L-NTG	35	21	11	3		21	14		32	3	

H-NTG: NTG patients with intraocular pressure at 16 mmHg-21mmHg.

L-NTG: MTG patients with maximal intraocular pressure at 15mmHg or less.

Table 28.  $\beta$ 1-Adrenalin Receptor Arg389Gly

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CG	GG		CC	CG+GG		CC+CG	GG	
Control	240	147	78	15		147	93		225	15	
POAG	191	127	58	6		127	64		185	6	
NTG	284	197	80	7	0.028	197	87		284	7	0.031

Table 29. E-selectin 1402C&gt;T

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		CC	CT	TT		CC	CT+TT		CC+CT	TT	
Control	224	138	67	19		138	86		205	19	
POAG	250	150	90	10		150	100		240	10	0.042
NTG	176	117	53	6		117	59		170	6	0.037

Table 30. PON1 Gly192Arg (Q192R)

	N	Genotype			p	Genotype		p	Genotype		$\chi^2$ test p
		Frequency				Frequency			Frequency		
		QQ	QR	RR		QQ	QR+RR		QQ+QR	RR	
Control	224	32	107	85		32	192		139	85	
POAG	110	14	39	57	0.049	14	96	0.021	53	57	0.016
NTG	160	32	66	62		32	128		98	62	

5

10

Table 31. PON1 Leu55Met (L55M)

	N	Genotype Frequency			p	Genotype Frequency		p	Genotype Frequency		$\chi^2$ test p
		LL	LM	MM		LL	LM+MM		LL+LM	MM	
Control	226	192	34	0		192	34		226	0	
POAG	110	97	13	0		97	13		110	0	
NTG	160	144	15	1	0.013	144	16		157	3	
H-NTG	122	111	10	1		111	11		121	1	
L-NTG	34	29	3	2	0.054	29	5		32	2	0.009

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

### **IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**